

Untersuchungen zur mikrobiellen Diversität einer anaeroben, Trichlorbenzol-dechlorierenden Mischkultur

D i s s e r t a t i o n
zu Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Mikrobiologie
eingereicht an der



Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Dipl. Biol. Friedrich Wasmuth Lotar Frhr. v. Wintzingerode-Knorr
geboren am 20.8.1970 in Wolfsburg

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. H. Meyer

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. J. Rabe

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. B. Friedrich
 2. Prof. Dr. Dr. U.B. Göbel
 3. Prof. Dr. E. Stackebrandt

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Juli 1999

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Januar 1995 bis Mai 1998 am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité, Berlin durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. U. B. Göbel und Frau Prof. Dr. B. Friedrich möchte ich für die Themenstellung und die wissenschaftliche Betreuung sowie stete Diskussionsbereitschaft danken. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. E. Stackebrandt für seine langanhaltende Unterstützung danken, die sich auch auf die „Nach-DSMZ-Zeit“ erstreckte. Insbesondere Herrn Prof. Göbel und Herrn Prof. Stackebrandt sei dafür gedankt, daß sie aus mir einen begeisterten Mikroben-Jäger gemacht haben. Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, der „Studienstiftung des Deutschen Volkes“ und Prof. Göbel, die mir durch ihre finanzielle Hilfe diese Arbeit erst ermöglichten. Meinem Kooperationspartner Burkhard Selent danke ich für das freundschaftliche und produktive Zusammenarbeiten. Herrn Dr. F. A. Rainey möchte ich für die Archaea-Primersequenzen danken. Herrn Dr. R. Siddiqui danke ich für seinen Hinweis auf die Selenatreduzierer und seine praktische Hilfe bei den entsprechenden Versuchen. Herrn Dr. U. Rösick möchte ich ganz besonders für die Selen-Messungen danken. Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene, insbesondere bei (ohne wertschätzende Reihenfolge) Marco Kachler, Anke Friedrich, Cord Schlötelburg, Klaus Heuner, Annette Moter, Bong-Kyu Choi, Tina Fiedler, Cindy Hefenbrock, Angela Pohlisch, Thomas Adam, Bärbel Graf und Mustafa El Fari möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bedanken.

ZUSAMMENFASSUNG

Chlorbenzole sind aufgrund ihrer weiten Verbreitung in Industrie und Landwirtschaft und ihrer geringen chemischen Reaktivität sowie guten Fettlöslichkeit ubiquitäre Umweltkontaminanten, die sich in der Nahrungskette anreichern. Eine natürliche, mikrobielle Dechlorierung dieser Verbindungen ist von besonderem Interesse, da die Toxizität chlorierter Benzole mit der Anzahl der Chlorsubstituenten steigt. Im Gegensatz zu Mono- und Dichlorbenzol, die durch aerobe Laborreinkulturen dechlorierbar sind, werden höher chlorierte Benzole bevorzugt unter anaeroben Bedingungen in Mischkulturen mit unbekannter Spezieszusammensetzung dechloriert. Bioreaktoren, in denen solche undefinierten Mischkulturen kontinuierlich kultiviert werden, sind eine vielversprechende Technik bei der Behandlung Chlorbenzol-kontaminierter Abwässer. Aufgrund der unbekannten Zusammensetzung der Population muß die mikrobielle Aktivität jedoch als „black box“ betrachtet werden, was eine direkte Steuerung und Optimierung solcher Bioreaktoren erschwert. Zur Bestimmung der mikrobiellen Diversität einer in ihrer Zusammensetzung unbekannten, Trichlorbenzol(TCB)-dechlorierenden Bioreaktorkultur wurde aufgrund der bekannten Limitierungen kulturabhängiger Methoden die kulturunabhängige, vergleichende Sequenzanalyse direkt amplifizierter und klonierter 16S-rDNA gewählt. Die durch eine neuentwickelte Hybridisierungsmethode wesentlich vereinfachte Analyse der 16S-rDNA-Genbibliotheken erlaubte eine phylogenetische Klassifizierung der in der TCB-dechlorierenden Mischkultur abundanten Mikroorganismen (Bakterien und Archaea) und zeigte das Auftreten von 51 bakteriellen 16S-rDNA-Klonfamilien, mit einem weiten phylogenetischen Spektrum und teilweise enge Verwandtschaften zu anaerob dechlorierenden *Dehalobacter* spp. oder zu unkultivierten Bakterien eines vergleichbaren Biotops. Dieser Diversität stand eine dominierende *Methanosaeta*-ähnliche Klonfamilie innerhalb der Archaea gegenüber. Die aus der phylogenetischen Klassifizierung abgeleiteten metabolischen Eigenschaften einiger Bakterien und Archaea der TCB-dechlorierenden Mischkultur konnten durch gezielte Anreicherung und in-vitro Kultivierung bzw. die kulturunabhängige Sequenzanalyse funktioneller Gene bestätigt werden. Die dargestellten Ergebnisse lassen eine spezifische Zusammensetzung der TCB-dechlorierenden Mischkultur vermuten und geben Hinweise auf Indikatororganismen, die ein Monitoring und eine damit verbundene Effizienzsteigerung der anaeroben TCB-Dechlorierung im Bioreaktor ermöglichen könnten.

Schlagwörter:

Trichlorbenzol, anaerobe Dechlorierung, Flußsediment, Mischkultur, 16S-rDNA, PCR, Polynukleotidsonden, *Dehalobacter*, *nifH*-Gen, anaerobe Selenatreduktion

ABSTRACT

Due to their widespread application in industry and agriculture and their chemical stability chlorobenzenes (CB) are ubiquitous pollutants in soil, sediments, and aquifers. Since toxicity of CBs increases with the number of chlorine substituents, microbial dechlorination of CBs is of major interest. In contrast to di- and monochlorobenzenes (DCB and MCB) higher chlorinated benzenes are more resistant to aerobic dechlorination. However, for these compounds reductive dechlorination by different anaerobic microbial communities is well known. Bioreactors inoculated with complex dechlorinating anaerobic microbiota seem to be promising technologies for bioremediation of CB-contaminated aquifers. Several studies showed the efficiency of such bioreactors in treating chloroaromatic contaminated wastewaters. However, due to the unknown species diversity microbial activity had to be treated as a „black box“ and direct optimization was hampered. To determine the microbial diversity of an anaerobic consortium in a fluidized bed reactor used for dechlorination of trichlorobenzene (TCB) I employed comparative sequence analysis of 16S rRNA genes after direct PCR-amplification and cloning from community DNA since culture-based methods have shown to be strongly biased. The application of a new hybridization based screening approach for bacterial 16S rDNA clone libraries drastically simplified the analysis and allowed the phylogenetic classification of the abundant bacteria and archaea. A total of 51 bacterial 16S rDNA clone families were found, which showed a wide distribution among the main bacterial phyla. Several bacterial 16S rDNA clone families were closely related to anaerobic, dechlorinating *Dehalobacter* spp. and to yet-uncultured bacteria of a similar habitat. In contrast to the high bacterial diversity archaeal 16S rDNA clone libraries were clearly dominated by a *Methanosaeta concillii*-like clone family. Some yet-uncultured bacteria and archaea of the TCB-dechlorinating consortium were sufficiently closely related to studied organisms that reasonable physiological hypotheses could be formulated. These hypotheses were confirmed by either cultivation of the respective organism or by culture-independent sequence analysis of specific functional genes. The results suggest a specific community structure of the TCB-dechlorinating consortium and give evidence for indicator organisms. Molecular genetic monitoring of these indicator organisms might allow the optimization of the continuous TCB-dechlorination in the fluidized bed reactor.

Keywords:

Trichlorobenzene, anaerobic dechlorination, river sediment, mixed bacterial culture, 16S rDNA, PCR, polynucleotide probes, *Dehalobacter*, *nifH* gene, anaerobic selenate reduction

INHALTSVERZEICHNIS

	ZUSAMMENFASSUNG.....	I
	INHALTSVERZEICHNIS.....	II
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
I	EINLEITUNG	
1	Chlorbenzole in der Umwelt.....	1
2	Mikrobielle Dehalogenierung chlororganischer Verbindungen.....	2
3	Einsatz mikrobieller Konsortien in Bioreaktoren zur anaeroben Dechlorierung chlororganischer Verbindungen.....	8
4	Kulturunabhängige, molekulare Analyse mikrobieller Diversität.....	9
5	Ziel der Arbeit.....	13
6	Analyseschema.....	14
II	MATERIAL UND METHODEN	
1	MATERIAL	
1.1	Anaerobes, Trichlorbenzol-dechlorierendes Konsortium.....	15
1.2	Chemikalien.....	17
1.2.1	Fotochemikalien.....	17
1.2.2	DNA-Marker.....	18
1.2.3	Kits.....	18
1.2.4	Oligonukleotide.....	18
1.3	Puffer und Lösungen.....	20
1.4	Nährmedien.....	20
1.4.1	Nährmedien zur Anzucht von Referenzstämmen.....	20
1.4.2	Nährmedien zur Anreicherung und Isolierung von Bakterien.....	20
1.4.2.1	Aerob-Medien.....	21
1.4.2.2	Anaerob-Medien.....	22
1.4.3	Medien für rekombinante <i>E. coli</i> Stämme.....	23
2	METHODEN	
2.1	Anreicherung und Isolierung von Bakterien aus Bioreaktormaterial.....	23
2.1.1	Entnahme von Bioreaktormaterial zur Anreicherung und Isolierung von Bakterien.....	23
2.1.2	Isolierung fakultativ aerober Bakterien.....	24
2.1.3	Isolierung anaerober Bakterien.....	24
2.1.3.1	Isolierung nitratreduzierender Bakterien.....	24

2.1.3.2	Isolierung selenatreduzierender Bakterien.....	25
2.1.3.2.1	Nachweis der Reduktion von Selenat zu Selen.....	25
2.2	Stammhaltung.....	25
2.3	Präparation von Nukleinsäuren.....	26
2.3.1	Entnahme von Bioreaktormaterial zur DNA-Präparation.....	26
2.3.2	Präparation von DNA aus Bioreaktormaterial.....	26
2.3.3	Präparation von DNA aus mikrobiellen Reinkulturen.....	26
2.3.4	Präparation von Plasmid-DNA aus rekombinanten <i>E. coli</i> -Zellen (Mini-Prep).....	27
2.3.5	Präparation von Nukleinsäuren aus rekombinanten <i>E. coli</i> -Zellen für die Slot-Blot Hybridisierung (Colony Slot-Blot).....	28
2.4	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	28
2.4.1	Agarosegele.....	28
2.4.2	Polyacrylamidgele.....	29
2.5	Quantitative Analyse von Nukleinsäuren.....	30
2.6	In-vitro Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
2.6.1	PCR-Amplifizierung der 16S-rDNA aus Bakterien-Reinkulturen.....	31
2.6.2	PCR-Amplifizierung der 16S-rDNA aus Archaea-Reinkulturen.....	31
2.6.3	PCR-Amplifizierung der 16S-rDNA aus Konsortiums-DNA.....	31
2.6.4	PCR-Amplifizierung von <i>nifH</i> -Genfragmenten aus Konsortiums-DNA.....	32
2.6.5	PCR-Amplifizierung klonierter DNA.....	33
2.6.6	PCR-Amplifizierung und DIG-Markierung von 16S-rDNA-Fragmenten.....	34
2.6.7	Direkte Aufreinigung PCR-amplifizierter DNA.....	35
2.7	Klonierung PCR-amplifizierter DNA.....	36
2.7.1	TA-Klonierung.....	36
2.7.2	LIC-Klonierung.....	36
2.7.2.1	Präparation des PCR-Produktes.....	36
2.7.2.2	Präparation des Plasmid-Vektors.....	37
2.7.2.2.1	Restriktionsverdau von pUC19 mit <i>Xba</i> I.....	37
2.7.2.2.2	PCR-Amplifizierung linearisierter pUC19-DNA.....	37
2.7.2.3	T4-DNA-Polymerase Behandlung.....	37
2.7.2.4	Klonierung und Transformation.....	38
2.7.3	Anlage von 16S-rDNA Genbibliotheken aus Konsortiums-DNA.....	38

2.7.4	Anlage von <i>nifH</i> -Genbibliotheken aus Konsortiums-DNA.....	39
2.8	DIG-Markierung von Oligonukleotiden.....	40
2.9	Sequenzierung von DNA.....	40
2.10	Vergleichende 16S-rDNA Sequenzanalyse.....	41
2.11	Vergleichende Sequenzanalyse abgeleiteter <i>nifH</i> -Genprodukte.....	42
2.12	Filterhybridisierungen.....	42
2.12.1	Dot-Blot.....	42
2.12.2	Slot-Blot (Colony-Slot-Blot).....	42
2.12.3	Hybridisierung mit DIG-markierten DNA-Sonden.....	43
2.13	In-situ-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden.....	45
2.13.1	Fixierung von Zellmaterial.....	45
2.13.2	Hybridisierung.....	45
2.13.3	Nachweis fluoreszenzmarkierter Zellen.....	46
III	ERGEBNISSE	
1	Charakterisierung des TCB-dechlorierenden Konsortiums durch Analyse von 16S-rDNA-Genbibliotheken.....	47
1.1	DNA-Extraktion und Anlage der 16S-rDNA-Genbibliotheken.....	47
1.2	Analyse der 16S-rDNA-Genbibliotheken A und B durch Hybridisierung mit DIG-markierten rDNA-Fragmenten.....	49
1.3	Bestimmung artifizieller, chimärer 16S-rDNA-Sequenzen.....	55
1.4	Phylogenetische Klassifizierung der SJA-Klonsequenzen durch vergleichende 16S-rDNA-Sequenzanalyse.....	55
1.5	Zusammensetzung der 16S-rDNA-Genbibliotheken C und D und phylogenetische Klassifizierung der Klonsequenzen durch vergleichende 16S-rDNA-Sequenzanalyse.....	61
1.6	Zusammensetzung der 16S-rDNA-Genbibliotheken E-H und phylogenetische Klassifizierung einzelner Klonsequenzen durch vergleichende 16S-rDNA-Sequenzanalyse.....	64
2	Charakterisierung des TCB-dechlorierenden Konsortiums durch vergleichende Analyse abgeleiteter NifH-Sequenzen.....	65
3	Gezielte Isolierung und Kultivierung von Bakterien des TCB-dechlorierenden Konsortiums.....	69
3.1	Isolierung und Charakterisierung fakultativ aerober und nitratreduzierender Bakterien.....	69
3.2	Isolierung und Charakterisierung selenatreduzierender Bakterien.....	71

4	Nachweis bisher nicht kultivierter Bakterien des TCB-dechlorierenden Konsortiums mittels 16S-rRNA-gerichteter Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	73
IV	DISKUSSION	
1	Bestimmung mikrobieller Diversität mittels kulturunabhängiger, molekulargenetischer Methoden.....	75
1.1	Einfluß experimenteller Faktoren auf die Bestimmung der mikrobiellen Diversität des TCB-transformierenden Konsortiums mittels direkter, PCR-vermittelter Analyse ribosomaler RNA-Gene.....	77
1.2	Analyse bakterieller rDNA-Genbibliotheken mittels Hybridisierung mit PCR-amplifizierten, DIG-markierten rDNA-Fragmenten.....	79
1.3	Rückschlüsse auf den Metabolismus der unkultivierten Mikroorganismen des TCB-dechlorierenden Konsortiums nach vergleichender 16S-rDNA-Sequenzanalyse.....	79
2	Ergänzende Untersuchungen zum Metabolismus einzelner Mikroorganismen des TCB-dechlorierenden Konsortiums.....	82
2.1	Isolierung fakultativ aerober sowie nitratreduzierender Bakterien.....	83
2.2	Isolierung selenatreduzierender Bakterien.....	84
2.3	Molekulargenetischer Nachweis stickstofffixierender Mikroorganismen.....	86
3	Einfluß der Kultivierungsbedingungen auf die Dechlorierungsleistung und Populationszusammensetzung des TCB-dechlorierenden Konsortiums.....	87
4	Ausblick.....	88
V	LITERATURVERZEICHNIS.....	90
VI	ANHANG.....	104

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
AAS	Atom-Absorptions-Spektroskopie
a. dest.	destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CBe	Chlorbenzoat
CM	Chlormethan
c	Zenti (10^{-1})
CP	Chlorphenol
CSPD	Dinatrium-3-(4-methoxyspiro{1,2-Doxetan-3,2'(5'Chloro)Tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]Decan}-4-yl)-Phenylphosphat
Cy-3	Cy-3-Indocarbocyaninfloureszenzfarbstoff
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DCB	Dichlorbenzol
DCM	Dichlormethan
DCP	Dichlorphenol
ddUTP	Didesoxyuridintriphosphat
DGGE	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese
DIG	Digoxigenin
DIG-11-dUTP	Digoxigenin-11-2'-Desoxyuridin-5'-Triphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM(Z)	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin
G+C	Mol% Guanin und Cytosin
h	Stunde(n)
HCB	Hexachlorbezol
i.d.R.	in der Regel
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaar
l	Liter
m	Meter, Milli (10^{-4})
M	Molar
MCB	Monochlorbenzol
mol	Mol
μ	Mikro (10^{-6})
min	Minute(n)
n	Nano (10^{-9})
OD	optische Dichte
OHPA	Hydroxyphenylacetat

p	Piko (10^{-12})
PAA	Polyacrylamid
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCE	Tetrachlorethen
PCR	Polymerase Kettenreaktion
rDNA	für rRNA kodierende Desoxyribonukleinsäure
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNase	Ribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannt
sp.	Spezies (Einzahl)
spp.	Spezies (Mehrzahl)
SSC	Standard Saline Citrat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCB	Trichlorbenzol
TCE	Trichlorethen
TeCB	Tetrachlorbenzol
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Uracil; Einheiten (Units)
ün	über Nacht
ÜS	Überstand
UV	Ultraviolett
V	Volt
VT	Volumenteile
X-Gal	5-chloro-4-bromo-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

I EINLEITUNG

1 Chlorbenzole in der Umwelt

Die chlorierten Derivate des Benzols bilden eine Gruppe chemisch stabiler, farbloser, angenehm riechender Verbindungen. Die sechs Wasserstoffatome des Benzolringes können durch Chlor substituiert werden, was zur Bildung zwölf verschiedener Chlorbenzole führt.

Seit 1909 erfolgt die industrielle Produktion von Chlorbenzolen. Nach dem Verbot der kommerziellen Nutzung von Hexachlorbenzol, das hauptsächlich als aktive Substanz in Fungiziden eingesetzt wurde, besitzen heute ausschließlich die Mono-, Di- und Trichlorbenzole industrielle Anwendungen. Die jährlich in den USA hergestellten 168000 bzw. 96700 Tonnen Mono- bzw. Dichlorbenzol (Stand 1989) werden für die Synthese chemischer Substanzen wie Chlornitrobenzol, Diphenylether und Sulfonpolymere eingesetzt oder dienen als Intermediate bzw. Lösungsmittel in der Produktion von Pestiziden, Pharmazeutika und Kunststoffen. Trichlorbenzole werden vornehmlich für die Herstellung von Farbstoffen, Pestiziden und dielektrischen Flüssigkeiten oder als Farbstoffträger in der Textilfärbung verwendet (USEPA, 1994).

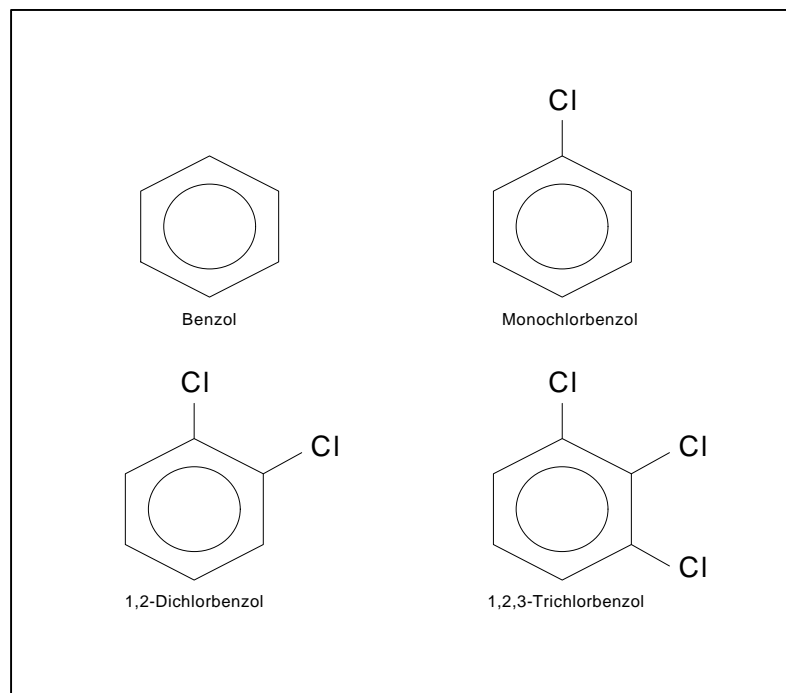


Abb. I.1.1 Strukturdarstellung chlorierter Benzole mit industrieller Anwendung. Die isomeren Formen des 1,2-Dichlorbenzols (1,3-DCB und 1,4-DCB) und die des 1,2,3-Trichlorbenzols (1,2,4-TCB und 1,3,5-TCB) sind nicht gezeigt.

Chlorbenzole gelangen sowohl auf direktem Weg bei der Anwendung chlorbenzolhaltiger Produkte wie Holzschutzmittel, Raumluchtdeodorants oder Lösungsmittel als auch indirekt durch prozessbedingte Leckagen bei der Herstellung und Weiterverarbeitung in die Umwelt. Daneben kann ein diffuser Eintrag bei der Behandlung von Abwässern und kontaminierten Böden sowie der Verbrennung von Altöl erfolgen (USEPA, 1994). Die hohen Produktionszahlen, vielfältigen Emissionsquellen und eine geringe Reaktivität bzw. biologische Abbaubarkeit führen zu einer ubiquitären Kontamination der Umwelt mit Chlorbenzolen. So werden chlorierte Benzole in Grund- und Oberflächenwässern, in Sedimenten, in landwirtschaftlich genutzten Böden und in der Atmosphäre gefunden (Williams et al., 1997; Oliver und Nicol, 1982; Wang et al., 1995; Hermanson et al., 1997).

Alle chlorierten Verbindungen des Benzols sind in Wasser schwer löslich und besitzen eine gute Fettlöslichkeit, die mit dem Chlorierungsgrad zunimmt. Dies führt zu einer Bioakkumulation in pflanzlichem und tierischem Gewebe (Oliver und Nicol, 1982; Beyer, 1996; Tam et al., 1996). Beim Menschen erfolgt eine Aufnahme über die Nahrung oder die Haut. Bei einer Untersuchung zur Belastung von US-Bürgern mit 1,4-DCB zeigten 98% der Probanden nachweisbare Mengen 1,4-DCB bzw. des Metaboliten 2,5-Dichlorphenol in Blut- und Urinproben (Hill et al., 1995). Diese Bioakkumulation von Chlorbenzolen ist mit einer Toxizität verbunden, die sich in Tier- und Zellkulturversuchen z.B. durch eine Reduktion der Wachstumsrate (Chaisuksant et al., 1998) und eine karzinogene Wirkung zeigt (Bomhard et al., 1988; Canonero et al., 1997; Gustafson et al., 1998). Sowohl Bioakkumulationsfaktoren als auch Toxizität steigen mit zunehmendem Chlorierungsgrad (Malle, 1984; USEPA, 1994).

2 Mikrobielle Dehalogenierung chlororganischer Verbindungen

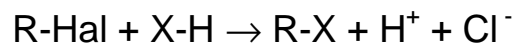
Chlorierte organische Verbindungen antropogenen Ursprungs gelten unter natürlichen Bedingungen als schwer abbaubar. Dabei wird die Abbaubarkeit sowohl von der Anzahl als auch der Position der Chlorsubstituenten beeinflusst. Aufgrund der Elektronegativität des Chloratoms ist eine Oxidation des Kohlenstoffgerüsts durch Sauerstoff erschwert. Dies gilt vor allem für chlororganische Verbindungen mit mehr als einem Chlorsubstituenten. Hinzu kommt, daß bei chlorierten Benzolen die Resonanzenergie des Benzolringes eine Verkürzung der Kohlenstoff-Chlor Bindung und damit eine Erhöhung der Bindungsstärke bewirkt. Dennoch kann die Chlor-

Kohlenstoff Bindung unter aeroben Bedingungen durch eine Reihe von Enzymen gespalten werden (zur Übersicht s. Fetzner und Lingens, 1994).

So können etwa sowohl chloraliphatische als auch chloraromatische Kohlenwasserstoffe durch Halidohydrolasen nach der folgenden Formel hydrolytisch gespalten werden (Fetzner und Lingens, 1994; Janssen et al., 1994):



Die Chlor-Kohlenstoff Bindung kann aber auch durch nukleophilen Angriff eines Thiols in einer Alkyl-Transferase-Reaktion übertragen werden. Ein gut untersuchtes Beispiel ist die Glutathion-S-Transferase-Reaktion, bei der der Alkylrest auf Glutathion übertragen wird (Fetzner und Lingens, 1994):



Für chlorierte Benzole sind zwei aerobe Dechlorierungsreaktionen beschrieben. Bei der „oxygenolytischen Dechlorierung“ wird durch Anlagerung von Sauerstoff ein instabiles Diol gebildet, das durch spontane Chlorideliminierung zum Chlorcatechol rearomatisiert (Beil et al., 1997):



Bei der „Dechlorierung nach Spaltung des aromatischen Ringes“ erfolgt keine spontane Dechlorierung des intermediären Diols sondern eine Dehydrogenierung zum Cl_4 -Catechol. Dieses wird anschließend durch erneute Oxygenierung unter Aufspaltung des aromatischen Ringes dechloriert (Potrawfke et al., 1998). Neben Untersuchungen zum aeroben Abbau von MCB (Nishino et al. 1992) und DCB (Spain und Nishino, 1987) ist bisher eine aerobe Dechlorierung höher chlorierter Benzole für 1,2,4-TCB (van der Meer et al., 1987), 1,2,3,4-TeCB (Potrawfke et al., 1998) und 1,2,4,5-TeCB (Beil et al., 1997) beschrieben.

Unter anaeroben Bedingungen können chloraliphatische und chloraromatische Kohlenwasserstoffe durch eine reduktive Spaltung der Chlor-Kohlenstoff Bindung dechloriert werden (reduktive Dechlorierung). Die reduktive Dechlorierung erfolgt entweder kometabolisch oder metabolisch in einer spezifischen Reaktion, die mit einem Energiegewinn für die Zelle verbunden ist. Bisher sind zwei Formen einer metabolischen, reduktiven Dechlorierung unter anaeroben Bedingungen beschrieben: (i) Die reduktive Abspaltung des Chlorsubstituenten von C₂ und C₃ Halokarbonsäuren wird von einer phototrophen Assimilierung der gebildeten Karbonsäure gefolgt. Dieses phototrophe Wachstum mit chlorierten aliphatischen Verbindungen ist bisher lediglich bei einigen schwefelfreien Purpurbakterien beobachtet worden (McGrath und Harfoot, 1997). (ii) Die reduktive Dechlorierung erfolgt als respiratorischer Prozeß, die sog. Halorespiration. Dabei dient die chlorierte Verbindung als terminaler Elektronenakzeptor in einer anaeroben Atmungskette (Wohlfarth und Diekert, 1997). Neben der reduktiven Dechlorierung ist die Alkyl-Transfer Reaktion als zweite anaerobe Dechlorierungsreaktion beschrieben (s. Abb. I.2.1). Sie ist ebenso wie die Halorespiration und das anaerobe, phototrophe Wachstum auf Halokarbonsäuren ein metabolischer Prozeß (Wohlfarth und Diekert, 1997).

Reduktive Dechlorierung

Als reduktive Dechlorierung bezeichnet man die Abspaltung eines Chlorsubstituenten von einem Kohlenstoffgerüst unter gleichzeitiger Übertragung von Elektronen. Nach Mohn und Tiedje (1992) kann die reduktive Dechlorierung durch zwei verschiedene chemische Mechanismen erfolgen: (i) Bei der Hydrogenolyse wird ein Chlorsubstituent durch ein Wasserstoffatom ersetzt. (ii) In der vicinalen Reduktion oder Dihaloelimination werden zwei Chlorsubstituenten von benachbarten Kohlenstoffatomen einer aliphatischen Verbindung abgespalten und eine Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen gebildet. Während die vicinale Reduktion nur für die kometabolische Umsetzung von 1,2-Dichlorethan zu Ethen durch methanogene Archaea beschrieben ist, wird eine Vielzahl chlorierter Alkyl- und Arylverbindungen durch eine Hydrogenolyse reduktiv dechloriert (zur Übersicht s. Holliger und Schraa, 1994). Die Autoren postulieren, daß eine Arylhydrogenolyse und somit auch die reduktive Dechlorierung chlorierter Benzole, ausschließlich metabolisch als Halorespiration verläuft. Demgegenüber kann eine

Alkylhydrogenolyse sowohl kometabolisch als auch metabolisch erfolgen. Eine gute Zusammenfassung der zahlreichen anaeroben oder fakultativ anaeroben Bakterien und Archaea, die eine kometabolische Alkylhydrogenolyse durchführen, wird durch Holliger und Schraa (1994) und El Fantroussi et al. (1998) gegeben. Die reduktive Dechlorierung ist als initialer Schritt in der anaeroben Degradation chlororganischer Verbindungen anzusehen (Sharak-Genthner et al., 1989; Häggblom et al., 1996). Diese Biodegradation ist mit Ausnahme der oben genannten Assimilierung chlorierter Karbonsäuren durch phototrophe Bakterien das Ergebnis einer Syntrophie, d.h. einer engen Interaktion zwischen verschiedenen Mikroorganismen zum wechselseitigen Nutzen. Das am besten untersuchte Beispiel ist das anaerobe Wachstum einer definierten methanogenen Mischkultur mit 3-Chlorbenzoat (zur Übersicht s. Mohn und Tiedje, 1992). Dieses Konsortium besteht neben dem dechlorierenden Bakterium *Desulfomonile tiedjei* aus dem Benzoat-vergärenden Bakterium Stamm BZ-2 und dem H₂-verbrauchenden methanogenen Archaeon *Methanospirillum* sp. In syntropher Wechselwirkung erfolgt die reduktive Dechlorierung von 3-Chlorbenzoat durch *D. tiedjei*, die Vergärung des gebildeten Benzoats durch Stamm BZ-2 und ein Verbrauch des aus der Benzoatvergärung gebildeten Wasserstoffs sowohl durch *D. tiedjei* als auch durch *Methanospirillum* sp. Durch den kontinuierlichen Verbrauch von Wasserstoff wird wiederum der für die Benzoatvergärung notwendige niedrige Wasserstoffpartialdruck gewährleistet. *Methanospirillum* sp. bzw. *D. tiedjei* nutzen den Wasserstoff als Elektronendonator für die Bildung von Methan bzw. die reduktive Dehalogenierung. Zwischen beiden Organismen herrscht kein Wettbewerb um Wasserstoff, vielmehr stimuliert ihre Kombination die Benzoatvergärung und somit die Wasserstoffbildung. Neben diesen Nährstoffflüssen wird die Synthese und Bereitstellung von Vitaminen durch Stamm BZ-2 und *Methanospirillum* sp. vermutet, die eine Dechlorierung durch *D. tiedjei* ermöglichen.

Alkyl-Transfer Reaktion

Diese anaerobe Dechlorierungsreaktion ist nur für die zwei strikt anaeroben, homoacetogenen Bakterien *Dehalobacterium formicoaceticum*, Stamm DMC (Mägli et al., 1996) und „*Acetobacterium dehalogenans*“, Stamm MC (Traunecker et al., 1991) beschrieben. Diese Organismen nutzen Di- bzw. Chlormethan als Energie- und Kohlenstoffquelle, indem sie die Alkylgruppe der chlorierten Methane auf Kohlendioxid übertragen. Vermutlich stehen auch Organismen, die eine Alkyl-

Transfer Reaktion durchführen in syntropher Wechselwirkung mit begleitenden nicht dechlorierenden Mikroorganismen. Dies wird aus der wesentlich längeren Wachstumszeit von *D. formicoaceticum* gegenüber der ursprünglichen Zweikomponentenkultur DC deutlich, aus der *D. formicoaceticum* isoliert wurde (zur Übersicht s. El Fantroussi et al., 1998).

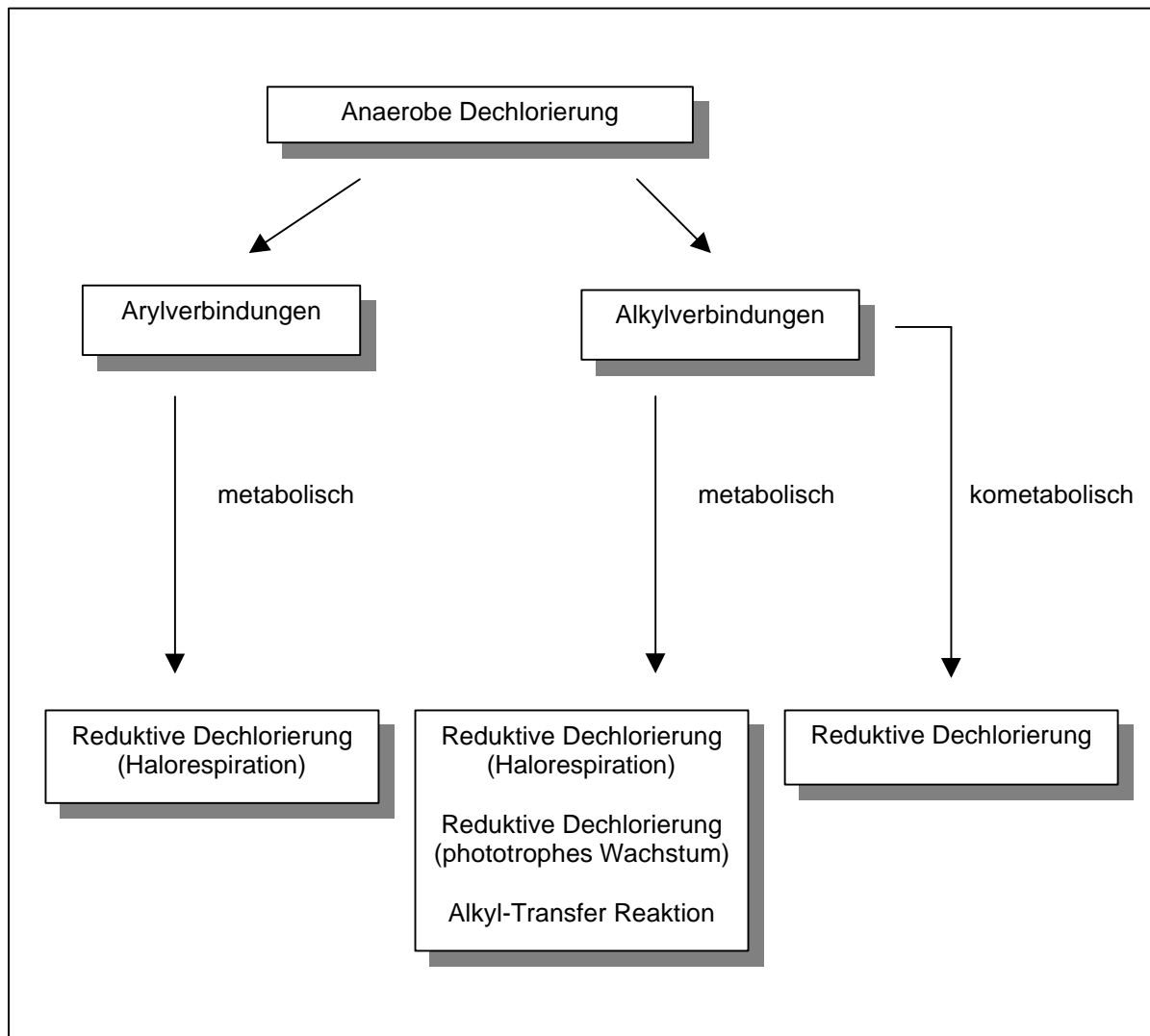


Abb. 1.2.1 Graphische Darstellung der bei anaeroben oder fakultativ anaeroben Mikroorganismen beobachteten Strategien zur Dechlorierung chloraliphatischer (Alkyl-) und chloraromatischer (Aryl-) Verbindungen.

Im Gegensatz zu Mikroorganismen, die chlororganische Verbindungen kometabolisch dechlorieren, können solche, die eine metabolische Dechlorierungsreaktion durchführen, gezielt angereichert und kultiviert werden. Aufgrund der syntrophen Wechselwirkungen zwischen anaeroben dechlorierenden Bakterien und begleitenden Mikroorganismen, den allgemeinen technischen Schwierigkeiten bei der Kultivierung anaerober Bakterien und der Toxizität sowie geringen Wasserlöslichkeit einiger chlororganischer Verbindungen ist jedoch die Zahl entsprechender Isolate gering (s. Tab. I.2.1). Die Isolierung einer haloinspirierenden Reinkultur, die chlorierte Benzole als terminalen Elektronenakzeptor nutzt, ist bisher nicht publiziert. Wenngleich in den letzten drei Jahren wichtige Erkenntnisse zur Biochemie der Haloinspiration und Alkyl-Transferase Reaktion gesammelt werden konnten (zur Übersicht s. Wohlfarth und Diekert, 1997), existieren nahezu keine publizierten Daten zur Genetik der beteiligten Enzymsysteme.

Tab. I.2.1 Anaerobe Bakterien, die aufgrund ihrer Fähigkeit zur metabolischen Dechlorierung aus der Umwelt isoliert wurden (erweitert nach El Fantroussi et al., 1998).

Organismus	Chlor-Verbindung ^a	Referenz
<i>Desulfomonile tiedjei</i>	3-CBe	DeWeerd et al. (1990)
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	3-Cl-4-OHPA; 2,4-DCP	Utkin et al. (1994)
<i>Desulfitobacterium</i> sp., PCE1	2,4,6-TCP; PCE	Gerritse et al. (1996)
<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	3-Cl-4-OHPA	Christiansen und Ahring (1996)
<i>Desulfitobacterium chlororespirans</i>	3-Cl-4-OHPA; 2,3-DCP	Sanford et al. (1996)
<i>Desulfitobacterium frappieri</i>	PCP	Bouchard et al. (1996)
Isolat TT4B	PCE, TCE	Krumholtz et al. (1996)
Isolat 2 CP-1	2-CP	Cole et al. (1994)
<i>Dehalospirillum multivorans</i>	PCE	Scholtz-Muramatsu et al. (1995)
<i>Dehalobacter restrictus</i>	PCE	Holliger et al. (1998)
<i>Dehalobacter</i> sp., TEA	PCE, TCE	Wild et al. (1996)
„ <i>Dehalococcoides ethenogenes</i> “	PCE	Maymó-Gatell et al. (1997)
„ <i>Acetobacterium dehalogenans</i> “ *	CM	Traunecker et al. (1991)
<i>Dehalobacterium formicoaceticum</i> *	DCM	Mägli et al. (1996)

^aCBe: Chlorbenzoat. 3-Cl-4-OHPA: 3-Chlor-4-Hydroxyphenylacetat. CP: Chlorphenol. DCP: Dichlorphenol. TCP: Trichlorphenol. PCE: Tetrachlorethen. TCE: Trichlorethen. CM: Chlormethan. DCM: Dichlormethan. *: Diese Stämme führen eine Alkyl-Transferase Reaktion durch.

3 Einsatz mikrobieller Konsortien in Bioreaktoren zur anaeroben Dechlorierung chlororganischer Verbindungen

Undefinierte mikrobielle Mischkulturen, die im folgenden als mikrobielle Konsortien bezeichnet werden, sind bereits in zahlreichen Untersuchungen zur anaeroben Dechlorierung von chlororganischen Verbindungen mittels Bioreaktoren eingesetzt worden. So konnten etwa die in der anaeroben Abwasserbehandlung häufig eingesetzten UASB-Reaktoren („Upflow Anaerobic Sludge Blanket“) zur anaeroben Dechlorierung chlorierter Phenole verwendet werden, nachdem sie mit Anreicherungskulturen bzw. adaptierten Sedimenten oder Klärschlämmen inokuliert wurden (zur Übersicht s. Christiansen et al., 1995). Weitere Arbeiten beschreiben den Einsatz immobilisierter mikrobieller Konsortien in einem Wirbelschichtreaktor (Flora et al., 1994) und einem Festbettreaktor (Boucquey et al., 1995) zur anaeroben Dechlorierung von Chlorphenolen bzw. eines Gemisches chloraliphatischer Verbindungen. In diesen Untersuchungen und in der Arbeit von Woods et al. (1989) erfolgte die anaerobe Dechlorierung in wässrigen Lösungen, die die Zusammensetzung industrieller Abwässer imitierten. Mikrobielle Konsortien sind für eine Dechlorierung industrieller Abwässer oder kontaminierter Grundwässer möglicherweise besser geeignet als Reinkulturen dechlorierender Mikroorganismen, da diese nach längerer Betriebszeit der Bioreaktoren durch autochthone Mikroorganismen verdrängt werden können (Massol-Deyá et al., 1997; Jones et al., 1998). Die unbekannte Zusammensetzung mikrobieller Konsortien kann jedoch den Einsatz bei der Dechlorierung einschränken, da das aktive Konsortium als undefiniertes System oder „black box“ betrachtet werden muß und so eine gezielte Steuerung oder Optimierung der Bioreaktoren erschwert ist.

In der Literatur sind eine Reihe anaerober mikrobieller Konsortien beschrieben, die chlorierte Benzole reduktiv dechlorieren (Bosma et al., 1988; Holliger et al., 1992; Ramanand et al., 1993; Nowak et al., 1996; Middeldorp et al., 1997). Die kontinuierliche Kultivierung in einem Bioreaktor ist bisher jedoch nur für eines dieser Konsortien beschrieben (Nowak, 1994; Nowak et al., 1996). Die mikrobiologische Analyse dieser Bioreaktorkultur ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

4 Kulturunabhängige, molekulare Analyse mikrobieller Diversität

Der Begriff „Biodiversität“ umschreibt in seiner einfachsten Definition die Vielfalt aller Lebensformen, d.h. die der meist einzelligen Mikroorganismen und der mehrzelligen höheren Organismen. Unsere bisherigen Einsichten in biologische Diversität beruhen jedoch überwiegend auf der Analyse höherer Lebensformen und klammern die Vielfalt mikrobiellen Lebens nahezu vollständig aus. Dies wird am eindrucksvollsten durch die etwa 500.000 beschriebenen Insektenspezies dokumentiert, denen nur etwa 5000 beschriebene nicht-eukaryotische Mikroorganismen gegenüberstehen (Bull et al., 1992; Pace, 1997). Die Gründe für unsere unzureichende Kenntnis mikrobieller Diversität liegen zweifelsohne in der geringen Größe von Mikroorganismen und dem Mangel an unterscheidbaren Morphotypen, so daß eine mikroskopische Differenzierung nicht gelingt. Die in-vitro Kultivierung von Mikroorganismen ermöglicht zwar eine weitreichende phänotypische und genotypische Charakterisierung und Identifizierung, führte jedoch in der Vergangenheit zu der Verzerrung natürliche mikrobielle Populationen ausschließlich anhand der Fraktion in-vitro kultivierter Vertreter zu beschreiben. Daß dies eine extreme Unterschätzung mikrobieller Diversität bedeutet, wird beispielsweise durch die häufig beobachtete Differenz zwischen Direkt- und Lebendzellzahlbestimmung und die zahlreichen, anhand ihres auffälligen Morphotyps charakterisierten, unkultivierten mikrobiellen Symbionten von Termiten (To et al., 1980) oder anaeroben Ciliaten (Fenchel et al., 1977) belegt. Amann et al. (1995) schätzen den Anteil bisher kultivierter Mikroorganismen in meso- bis eutrophen Habitaten wie Sedimenten, Boden oder Belebtschlamm auf 0.1-15%. Lediglich für das oligotrophe Habitat Trinkwasser ist dieser Prozentsatz wesentlich höher (Kalmbach et al., 1997). Solche Schätzungen sind in guter Übereinstimmung mit den Untersuchungen zur genotypischen Diversität von Mikroorganismen mittels DNA-DNA Hybridisierungsraten, die allein in einigen Boden- und Sedimentproben die Anwesenheit von 4000-10000 genomisch unterschiedlichen Mikroorganismen zeigen (Torsvik et al., 1990 und 1998). Diese Zahl übersteigt die Anzahl bisher kultivierter Bakterien und Archaea um das doppelte. Die offenkundigen Limitierungen der seit Jahrzehnten angewandten kulturabhängigen Identifizierungsmethoden haben zu der paradoxen Situation geführt, daß trotz der ökonomischen Bedeutung von Mikroorganismen z.B. in der industriellen Biotechnologie oder Medizin unser Verständnis mikrobieller Diversität ausgesprochen gering ist (Bull et al., 1992).

Die von Zuckerkandl und Pauling (1965) angeregte und von Carl Woese und Mitarbeitern konsequent umgesetzte vergleichende Analyse ribosomaler RNA's, vor allem der 16S-rRNA, hatte die Entwicklung einer molekularen, auf der Phylogenie der Organismen basierenden Systematik zur Folge (zur Übersicht s. Woese, 1987). Die 16S-rRNA stellt aufgrund ihrer ubiquitären Verbreitung, ihrer funktionellen Konstanz und ihrer Unterteilung in Sequenzdomänen mit variierenden Substitutionsraten einen idealen molekularen Zeitmesser dar. Bereits in den siebziger Jahren erfolgte auf der Basis sog. Oligonukleotidkataloge die Einteilung aller Organismen in die drei Hauptentwicklungslinien *Bacteria*, *Archaea* (die zusammen auch als Prokaryoten bezeichnet werden) und *Eucarya* (zur Übersicht s. Woese, 1987; Stackebrandt, 1992). Bei dieser Methode werden die nach einer spezifischen Spaltung der 16S-rRNA durch Ribonuclease T1 entstehenden Oligonukleotide sequenziert und die erhaltenen Sequenzen mit denen anderer Organismen verglichen. Durch die Oligonukleotidkatalogisierung gelang Anfang der achtziger Jahre die erste 16S-rRNA-Sequenzanalyse eines in-vitro nicht kultivierbaren, symbiontischen Prokaryoten (Seewaldt und Stackebrandt, 1982). Dabei nutzten die Autoren das exklusive Vorkommen von *Prochloron* in seinem Wirt und den hohen rRNA-Gehalt mikrobieller Zellen für eine direkte Isolierung und Sequenzierung der 16S-rRNA. Die Entwicklung der direkten rRNA-Sequenzierung mittels reverser Transkriptase (Lane et al., 1985) sowie molekularbiologischer Methoden zur Klonierung und Sequenzierung von DNA ermöglichten eine Weiterentwicklung dieses Ansatzes und die Ausdehnung auf mikrobielle Mischpopulationen. In ihrem Artikel „The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences“ entwickelten Pace et al. (1986) anhand zahlreicher Beispiele ein generelles Konzept zur kulturunabhängigen Bestimmung mikrobieller Diversität und markierten damit den Beginn der durch Akkermans et al. (1994) definierten „molekularen Ökologie“. Die Analyse der 16S-rRNA unkultivierter Mikroorganismen erfolgte zunächst entweder durch Filterhybridisierung direkt extrahierter rRNA (Stahl et al., 1988), direkte rRNA-Sequenzierung (Pace et al., 1986), shot-gun-Klonierung genomischer DNA und anschließender Analyse der rekombinanten *E. coli*-Klone mit einem rDNA-Insert (Pace et al., 1986; Schmidt et al., 1991) oder reverser Transkription der direkt isolierten 16S-rRNA und anschließender Klonierung der cDNA in *E. coli* (Weller und Ward, 1989). Die Einführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und die Entwicklung zahlreicher 16S-rDNA Amplifizierungs- und Sequenzierprimer (Weisburg

et al., 1991) bedeutete eine wichtige methodische Erleichterung, da nun die für die 16S-rRNA kodierenden Gene direkt aus genomischer DNA amplifiziert und anschließend kloniert werden können und somit eine reverse Transkription oder ein aufwendiges Screening genomischer Genbibliotheken umgangen wird (Giovannoni et al., 1990). In den letzten Jahren wurde die PCR-vermittelte Analyse ribosomaler RNA durch zahlreiche methodische Ergänzungen variiert bzw. erweitert. Muyzer et al. (1993) adaptierten die Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) zur Auftrennung PCR-amplifizierter rDNA-Fragmente, um so den arbeitsintensiven Klonierungsschritt zu umgehen. Daneben wurden Verfahren entwickelt, die in Ergänzung zur DNA-Sequenzierung eine schnelle Analyse von rDNA-Genbibliotheken ermöglichen, wie etwa die Hybridisierung mit sog. gruppenspezifischen Oligonukleotidsonden (Liesack und Stackebrandt, 1992), die Verwendung spezifischer rDNA-Polynukleotidsonden (von Wintzingerode et al., 1999) oder die Analyse rekombinanter Klone mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) (Weidner et al., 1996). Ein weiterer wichtiger Schritt war die Entwicklung der 16S-rRNA-gerichteten In-situ-Hybridisierung (DeLong et al., 1989; Amann et al., 1990), die eine Quantifizierung der lediglich durch rRNA-Sequenzen charakterisierten unkultivierten Mikroorganismen in ihrem Habitat erlaubt und mit der PCR-vermittelten rRNA-Analyse in dem Konzept der „full-cycle-rRNA-analysis“ zusammengefasst ist (Amann et al., 1995). In Verbindung mit dem hohen Automatisierungsgrad der DNA-Sequenzierung ermöglichten diese technischen Neuerungen die Untersuchung einer Vielzahl unterschiedlicher mikrobieller Mischpopulationen, z.B. aus Waldböden (Liesack und Stackebrandt, 1992; Bornemann und Triplett, 1997), Ackerböden (Bornemann et al., 1996; Engelen et al., 1998), Torf (Rheims et al., 1996), Belebtschlamm (Schuppler et al., 1995; Snaidr et al., 1997, Juretschko et al., 1998), heißen Quellen (Barns et al., 1994; Hugenholtz et al., 1998), Parodontitis-Läsionen (Choi et al., 1994) oder aus Chlororganika-kontaminierten Habitaten (Dojka et al., 1998; von Wintzingerode et al., 1999). Die vergleichende Analyse der in diesen Untersuchungen ermittelten 16S-rRNA Sequenzen zeigte übereinstimmend die große Diskrepanz zwischen der durch mikrobielle Reinkulturen repräsentierten 16S-rDNA-Vielfalt und der natürlichen Diversität. Wenngleich die PCR-vermittelte Analyse ribosomaler RNA, wie jeder methodische Ansatz, eine Reihe von Fehlermöglichkeiten beinhaltet (zur Übersicht s. von Wintzingerode et al., 1997), so ermöglicht sie jedoch durch die phylogenetische

Charakterisierung der einzelnen Organismen natürlicher mikrobieller Populationen die Erstellung eines Grundgerüsts, an dem sich weitere (molekulare) Untersuchungen orientieren können. Pace (1997) plädiert für die systematische Bestimmung mikrobieller Diversität in ausgewählten, chemisch unterschiedlich definierten Habitaten, um so u.a. zu klären, inwieweit sich mikrobielle Populationen zur Kartierung und zum Monitoring bio/geochemischer Prozesse eignen. Die Realisierung eines solchen „Umwelt-Genomprojektes“ erscheint mit Blick auf den hohen Automatisierungsgrad der DNA-Sequenzierungstechnologie möglich und würde sicherlich einen Meilenstein in der mikrobiellen Ökologie darstellen.

5 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der mikrobiellen Diversität einer bisher nicht charakterisierten anaeroben Trichlorbenzol-transformierenden Mischpopulation (Konsortium) durch eine kulturunabhängige vergleichende 16S-rDNA-Sequenzanalyse.

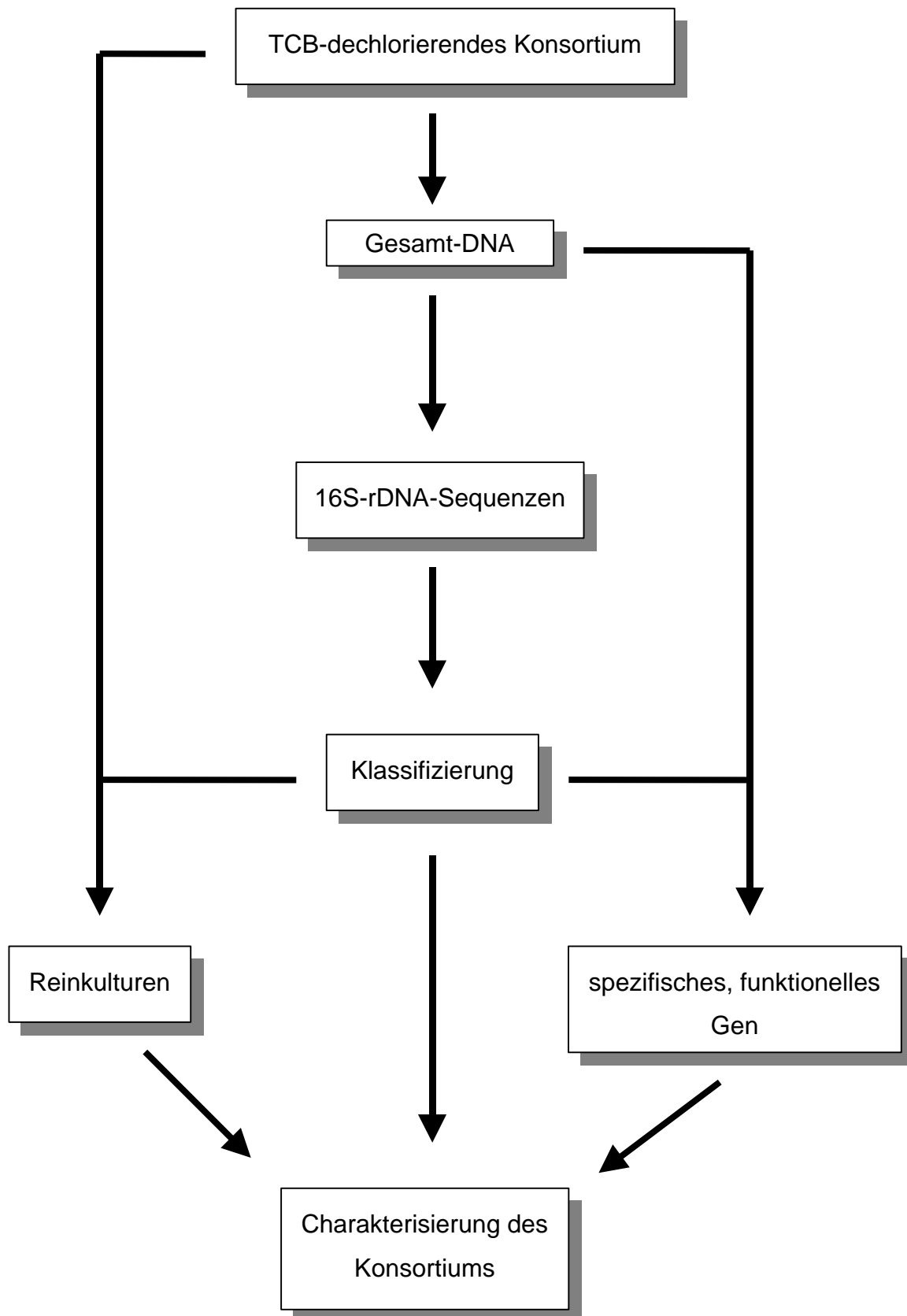
Den ersten Schritt stellte die Anlage von 16S-rDNA-Genbibliotheken dar, die einen möglichst repräsentativen Querschnitt der in dem Konsortium vorkommenden Mikroorganismen geben. Auf der Grundlage der in diesen Genbibliotheken enthaltenen 16S-rDNA-Sequenzen sollte durch rechnergestützte Sequenzanalyse und Datenbankabgleich eine phylogenetische Klassifizierung der im Konsortium vorkommenden Bakterien und Archaea erfolgen.

Ein wichtiger Punkt dieser Arbeit war es, aus den phylogenetischen Beziehungen zu bereits bekannten Mikroorganismen, Rückschlüsse auf die Physiologie der Mikroorganismen des Konsortiums zu ziehen.

Die Überprüfung dieser Hypothesen wurde durch die gezielte Isolierung von Reinkulturen und deren anschließende Charakterisierung mittels vergleichender 16S-rDNA-Sequenzanalyse sowie die kulturunabhängige vergleichende Sequenzanalyse spezifischer, funktioneller Gene angestrebt.

Ziel dieses mehrdimensionalen Ansatzes war es, ein möglichst genaues Bild der mikrobiellen Diversität des Trichlorbenzol-transformierenden Konsortiums zu erhalten, das als Basis für weiterführende Untersuchungen zur anaeroben, mikrobiellen Transformation von Chlorbenzolen dienen sollte.

6 Analyseschema



II MATERIAL UND METHODEN

1 MATERIAL

1.1 Anaerobes, Trichlorbenzol-dechlorierendes Konsortium

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte TCB-dechlorierende anaerobe Konsortium wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Hegemann (Technische Universität Berlin, Fachgebiet Siedlungswasserwirtschaft) aus belastetem Sediment der **Saale** bei **Jena (SJ)** angereichert und in einem Wirbelschichtreaktor kultiviert (s. Abb. II.1.1.1). Vorhergehende Untersuchungen hatten gezeigt, daß Anreicherungskulturen dieses Sediments alle Chlorbenzole (MCB bis HCB) reduktiv dechlorieren (Nowak et al., 1996). Die von Herrn Burkhard Selent durchgeführten Versuche zum Betrieb des Wirbelschichtreaktors erstreckten sich über den Zeitraum von August 1994 bis Dezember 1997. Wesentliches Ziel dieser Arbeiten war die kontinuierliche Mineralisierung von Trichlorbenzolen durch Kopplung der anaeroben Dechlorierung im Wirbelschichtreaktor mit dem Abbau der Dechlorierungsprodukte in einem weiteren nachgeschalteten aeroben Bioreaktor. In Tab. II.1.1.1 sind die Zeitpunkte der Entnahme von Probenmaterial aus dem anaeroben Wirbelschichtreaktor sowie Angaben zur Reaktorführung aufgelistet. Die Kultivierung erfolgte mit RAMM-Mineralsalzmedium (s. II.1.4.2.2) dem ein Gemisch der isomeren Trichlorbenzole (1,2,3-TCB; 1,2,4-TCB; 1,3,5-TCB je 10 mg/l), Natrium-Acetat und Methanol (je 100 mg/l) zugesetzt wurden. Während des kontinuierlichen Betriebes des anaeroben Wirbelschichtreaktors blieben Redoxpotential und pH-Wert konstant bei Werten von unter -300 mV bzw. bei pH 7. Auch nach kurzzeitigem Sauerstoffeintrag, etwa durch Probennahmen oder gezielte Störungen, sank das Redoxpotential innerhalb weniger Tage auf den ursprünglichen Wert zurück. Das dem Bioreaktor zugeführte Mineralsalzmedium wies dabei Redoxpotentiale zwischen 0 und 50 mV auf. Weiterhin wurde eine kontinuierliche Gasentwicklung beobachtet. Vorhergehende Untersuchungen des TCB-dechlorierenden Konsortiums ließen vermuten, daß es sich bei den gebildeten Gasen um Methan und Kohlendioxid handelte (Nowak et al., 1996). Unabhängig vom Betriebszustand des anaeroben Wirbelschichtreaktors (alleinstehend oder in Kopplung mit einem nachgeschalteten aeroben Festbettreaktor) wurden alle zugesetzten Trichlorbenzole mit Eliminationsraten zwischen 80 und 90% zu DCB und MCB dechloriert. Dabei trat MCB als

Hauptdechlorierungsprodukt auf. In einigen Fällen konnte Benzol im Ablauf nachgewiesen werden, was auf eine Dechlorierung von MCB hinwies. Die Zugabe von Nitrat als alternativem Elektronenakzeptor bewirkte ein Ansteigen des Redoxpotentials und eine Verringerung der TCB-Dechlorierung.

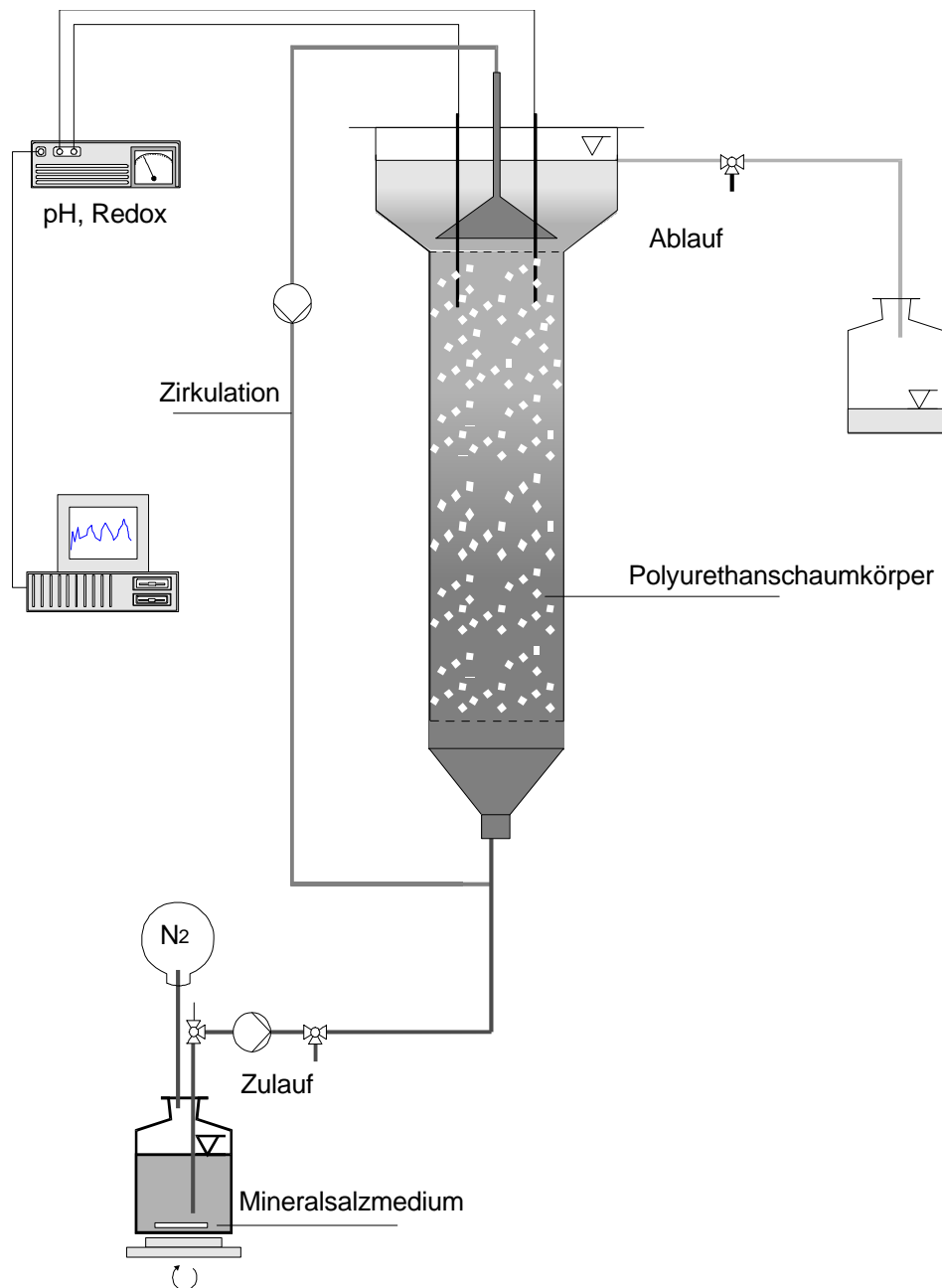


Abb. II.1.1.1 Schematische Darstellung des anaeroben Wirbelschichtreaktors zur kontinuierlichen Kultivierung des TCB-dechlorierenden Konsortiums (B. Selent, Technische Universität Berlin).

Tab. II.1.1.1 Betriebsbedingungen des Wirbelschichtreaktors zum Zeitpunkt der Probennahmen.

Zeitpunkt der Probennahme	Betriebsbedingungen
31.1.95	Keine Kopplung, kontinuierlicher Betrieb seit 6 Monaten
2.12.96	Keine Kopplung, RAMM-Medium ohne Nitrat, kontinuierlicher Betrieb seit 4 Monaten
9.12.96	Keine Kopplung, RAMM-Medium mit Nitrat
16.12.96	Keine Kopplung, RAMM-Medium ohne Nitrat
23.12.96	Keine Kopplung, RAMM-Medium mit Nitrat
27.11.97	Anaerob-aerob Kopplung

1.2 Chemikalien

Soweit nicht gesondert angegeben, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Feinchemikalien von den Firmen Boehringer, Mannheim, Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Fluka (Neu-Ulm), Bio-Rad (München) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

1.2.1 Fotochemikalien

Hyperfilm MP Röntgenfilm	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Polaroid-Film Type 665	Polaroid, England
Agfa APX 100 Schwarzweiß-Film	Agfa, Leverkusen
Röntgenfilm Entwickler für Automaten	Fuji, Düsseldorf
Röntgenfilm Fixierer für Automaten	Fuji, Düsseldorf

1.2.2 DNA-Marker

DNA-Marker II	Boehringer, Mannheim
DNA-Marker III	Boehringer, Mannheim
DNA-Marker XIV	Boehringer, Mannheim

1.2.3 Kits

TA-Cloning Kit	Invitrogen, de Schelp
AdvanTAge PCR Cloning Kit	Clontech, Heidelberg
DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit	Boehringer, Mannheim
DIG Luminescent Detection Kit	Boehringer, Mannheim
QiaQuick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Flexi-Prep Kit	Amersham-Pharmacia, Freiburg

1.2.4 Oligonukleotide

In Tab. II.1.2.4.1 sind die Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sowie deren Zielregionen aufgeführt. Wenn nicht gesondert vermerkt, wurden alle Oligonukleotide von TIB-MOLBIOL (Berlin) synthetisiert.

Neben den allgemein üblichen Abkürzungen wurden die folgenden Buchstabenkürzel für nicht näher spezifizierte Basenpositionen verwendet: M = C/A; N = A/T/G/C; R = A/G; W = A/T; Y = C/T; K = G/T; I = Inosin. Die nach Aslanidis et al. (1994) für die LIC-Klonierung (Ligation-Independent-Cloning) notwendigen zusätzlichen 12 Nukleotide am 5'-Ende der Primer sind kleingeschrieben dargestellt. Die unterstrichenen Nukleotide sind die Sequenzen der universellen Sequenzierprimer M13(21)F und M13(24)R.

Tab. II.1.2.4.1 Sequenzen und Zielregionen der verwendeten Oligonukleotide.

Name*	Sequenz (5' → 3')	Zielregion**
TPU1	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	16S, 8-27
TPU1-M13F ^f	<u>TGTAACACGACGGCCAGT</u> AGAGTTTGATCMTGGCTC	16S, 8-25
LIC-TPU1 ^f	gatggtagtaggAGAGTTTGATCMTGGCTCAG	16S, 8-27
TPU2	CCARACTCCTACGGGAGGCA	16S, 334-53
TPU5	AACTYAAAKGAATTGACGG	16S, 906-26
RTU2	TGCCTCCCGTAGGAGTYTGG	16S, 334-53
RTU3	GWATTACCGCGGCKGCTG	16S, 519-36
RTU5	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	16S, 906-26
RTU6	ATTGTAGCACGTGTGTMGCCC	16S, 1219-40
RTU8	AAGGAGGTGATCCANCCRCA	16S, 1522-41
RTU8-M13R ^f	<u>ACAGCTATGACCATG</u> AGGAGGTGATCCANCCRCA	16S, 1522-40
LIC-RTU8 ^f	gatggtagtaggAAGGAGGTGATCCANCCRCA	16S, 1522-41
10-30Fa [#]	TCCGGTTGATCCTGCC	16S, 8-23
10-30Fa-M13F ^f	<u>TGTAACACGACGGCCAGT</u> TCCGGTTGATCCTGCC	16S, 8-23
357Fa [#]	ACGGGGCGCAGCAGGC	16S, 344-59
1390Ra [#]	CGGTGTGTGCAAGGAGC	16S, 1385-1401
MCONC ^f	GAGTACGCTGGCAACTGT	16S, 1120-35
186+ ^f	TACCGTCATCCAGCGACT	16S, 469-87
118+ ^f	TGATGCCAGGGTCATAGG	16S, 182-92
EUB338 [‡]	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S, 338-55
Arch915 [±]	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	16S, 915-34
1114F [£]	GCAACGAGCGCAACCC	16S, 1100-15
1100R [£]	GGGTTGCGCTCGTTGC	16S, 1100-15
M13(24)R	AACAGCTATGACCATG	universell
M13(40)F	GTTTTCCAGTCACGAC	universell
M13(21)F	TGTAACACGACGGCCAGT	universell
M13(20)F	GTAACACGACGGCCAGT	universell
PDJ8012 [§]	cctactaccatcGGATCCCCGGGT	pUC19
PDJ8112 [§]	cctactaccatcGTCGACCTGCAG	pUC19
19F [†]	GCIWITYTAYGGIAARGGIGG	<i>nifH</i> , 19-38
407R [†]	AAICCRCCRCAIACIACRTC	<i>nifH</i> , 388-407

* TPU: Strangprimer für konservierte Bereiche der 16S rRNA Gene; RTU: Gegenstrangprimer für konservierte Bereiche der 16S rRNA Gene; ^f diese Arbeit; [†] Ueda et al. (1995); [‡] Amann et al. (1990); [±] Amann et al. (1990a); [§] Aslanidis et al. (1994); [£] Lane (1991); [#] F. A. Rainey (persönliche Mitteilung).

** 16S: *E. coli* 16S rRNA Position gemäß der Nummerierung nach Brosius et al. (1981); *nifH*: *Azotobacter vinelandii nifH* Gen Position (EMBL-Accession number: M20568); universell: Universeller Sequenzier- und Amplifikations Primer.

1.3 Puffer und Lösungen

TE-Puffer	0.01 M Tris-HCl 0.001 M EDTA
PBS-Puffer	8 g NaCl 0.2 g KCl 1.44 g Na ₂ HPO ₄ 0.24 g KH ₂ PO ₄ ad 1000 ml a. dest.; pH 7.4
10x TBE-Puffer (für Agarose Gele)	108 g Tris-Base 55 g Borsäure 6.42 g EDTA ad 1000 ml a. dest.; pH 8.0
10x TBE-Puffer (für DNA-Sequenzierung)	162 g Tris-Base 27.5 g Borsäure 7.3 g EDTA ad 1000 ml a. dest.
20x SSC-Lösung	175.3 g NaCl 88.2 g Natriumcitratdihydrat ad 1000 ml a. dest.; pH 7.0
Phosphat-Puffer	23.14 g KH ₂ PO ₄ 164.38 g K ₂ HPO ₄ ad 1000 ml a. dest.

1.4 Nährmedien

1.4.1 Nährmedien zur Anzucht von Referenzstämmen

Als Referenzen genutzte Bakterien- und Archaeastämme wurden gemäß der Angaben der Stammsammlungen kultiviert oder als Aktivkultur geliefert. Die Herstellung fester Nährmedien erfolgte durch Zugabe von 15 g/l Agar (Fluka, Neu-Ulm) vor dem Autoklavieren (20 min bei 121 °C).

1.4.2 Nährmedien zur Anreicherung und Isolierung von Bakterien

Die im folgenden aufgeführten Angaben beziehen sich auf die Herstellung von Flüssigmedien.

1.4.2.1 Aerob-Medien

OL-Medium (modifiziert nach Oldenhuis et al., 1989)

	5.4 g	Na_2HPO_4
	1.4 g	KH_2PO_4
	0.5 g	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
	0.2 g	MgSO_4
	0.001 g	Hefeextrakt
	5 mL	Spurenelementlösung
Spurenelementlösung:	ad 1000 ml	a. dest.
	700 mg	CaCl_2
	200 mg	FeSO_4
	10 mg	ZnSO_4
	10 mg	Borsäure
	10 mg	CoCl_2
	3 mg	MnSO_4
	0.3 mg	Na_2MoO_4
	2 mg	NiCl_2
	ad 1000 ml	a. dest.

OLA-Medium:

Wie OL-Medium, jedoch mit zusätzlich 1.7 mM Kalium-Acetat.

OLB-Medium:

Wie OL-Medium, jedoch mit 5 mM Natrium-Benzoesäure anstelle von Kalium-Acetat.

1.4.2.2 Anaerob-Medien

RAMM-Medium (Shelton und Tiedje, 1984):

Lösung 1:	5.3 g	NH_4Cl
	0.75 g	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
	1 g	$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
	0.2 g	FeCl_2
	ad 1000 ml	a. dest.
Lösung 2:	10.8 g	KH_2PO_4
	14 g	K_2HPO_4
	ad 1000 ml	a. dest.
Lösung 3:	50 mg	$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
	5 mg	Borsäure
	5 mg	ZnCl_2
	1 mg	CuCl_2
	1 mg	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
	50 mg	$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
	1 mg	NiCl_2
	5 mg	Na_2SeO_3
	ad 1000 ml	a. dest.

Zur Herstellung des Mediums wurden 100 ml Lösung 1, 25 ml Lösung 2 und 10 ml Lösung 3 vereinigt mit a. dest. auf 1000 ml aufgefüllt und anschließend autoklaviert.

RNA-Medium: Wie RAMM-Medium, jedoch mit zusätzlich 1.7 oder 3.4 mM Kalium-Acetat und 7 mM Kalium-Nitrat.

Se-Medium (modifiziert nach Macy et al., 1989):

2.2 g NaCl
 0.3 g KCl
 0.3 g NH₄Cl
 0.2 g KH₂PO₄
 0.15 g CaCl₂ x 2 H₂O
 0.4 g MgCl₂ x 6 H₂O
 0.6 g NaHCO₃
 3.78 g Na₂SeO₄
 10 ml SL8-Lösung

Dieser Ansatz wurde in 900 ml a. dest. gelöst und autoklaviert. Anschließend wurden folgende Lösungen hinzugegeben:

10 ml Vitaminlösung DSM 603 (sterilfiltriert)
 800 µl Methanol
 5 ml Kalium-Acetat (1M, sterilfiltriert)
 ad 1000 ml a. dest. (autoklaviert)

SL8-Lösung:

5.2 g EDTA-Na₂
 1.5 g FeCl₂ x 4 H₂O
 70 mg ZnCl₂
 100 mg MnCl₂ x 4 H₂O
 62 mg H₃BO₄
 190 mg CoCl₂ x 6 H₂O
 17 mg CuCl₂ x 2 H₂O
 24 mg NiCl₂ x 6 H₂O
 36 mg Na₂MoO₄ x 2 H₂O
 ad 1000 ml a. dest

Vitaminlösung DSM 603
(modifiziert nach DSMZ Katalog 1998):

0.1 mg Vitamin B₁₂
 2.0 mg Biotin
 5.0 mg Thiamine-HCl x 2 H₂O
 5.0 mg Calcium-Pantothenat
 2.0 mg Folsäure
 5.0 mg Riboflavin
 5.0 mg Nicotinamid

SN-Medium: Wie Se-Medium, jedoch mit zusätzlich 20 mM Kalium-Nitrat.

SNS-Medium: Wie SN-Medium, jedoch mit 1.2 g/l NaCl und zusätzlich 0.3 g/l Natriumsulfat.

SNS0.4-Medium: Wie SNS-Medium, jedoch mit zusätzlich 4 g/l Hefeextrakt.

SS0.1-Medium: Wie Se-Medium, jedoch mit 1.2 g/l NaCl, 0.3 g/l Natriumsulfat sowie 1 g/l Hefeextrakt.

SS0.4-Medium: Wie SS0.1-Medium, jedoch mit 4 g/l Hefeextrakt.

S40S0.4-Medium: Wie SS0.4-Medium, jedoch mit 7.56 g/l Natrium-Selenat (40 mM).

SSGY0.4-Medium: Wie SS0.4-Medium, jedoch mit 4 g/l Natrium-Gluconat anstelle von Kalium-Acetat.

1.4.3 Medien für rekombinante *E. coli* Stämme

Die im folgenden aufgeführten Angaben beziehen sich auf die Herstellung von Flüssigmedien.

TB-Medium:

12 g	Bacto-Trypton
24 g	Hefeextrakt
4 ml	Glycerin (87%)
ad 900 ml	a. dest.

nach dem Autoklavieren wurden 100 ml autoklavierter Phosphat-Puffer zugesetzt

TAXI-Medium:

wie TB-Medium, jedoch werden nach dem Autoklavieren zusätzlich zugegeben:

250 µl	Ampicilin (200 mg/ml)
200 µl	X-Gal (5-chloro-4-bromo-3-indolyl-β-D-galactopyranosid, 200 mg/ml in DMF)
50 µl	IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactosid, 1 M)

SOC-Medium:

20g	Bacto-Trypton
5 g	Hefeextrakt
0.5 g	NaCl
10 ml	KCl (250 mM)
ad 980 ml	a. dest., pH 7.0

nach dem Autoklavieren werden folgende Lösungen zugesetzt:

10 ml	MgCl ₂ (1 M, autoklaviert)
10 ml	Glucose (2 M, sterilfiltriert)

2 METHODEN

2.1 Anreicherung und Isolierung von Bakterien aus Bioreaktormaterial

2.1.1 Entnahme von Bioreaktormaterial zur Anreicherung und Isolierung von Bakterien

Über einen seitlichen Auslasshahn wurden am 27.11.97 drei sterile Schottflaschen mit Reaktorflüssigkeit gefüllt. Anschließend wurden mit einer zuvor abgeflammt Pinzette acht bewachsene Polyurethanschaumkörper aus dem geöffneten Reaktor entnommen und auf die drei Probengefäße verteilt. Für den etwa 30 minütigen Transport diente ein vorgewärmter Thermobehälter. Der Inhalt eines Probengefäßes wurde unmittelbar für aerobe Anreicherungsversuche weiterverarbeitet, während die beiden anderen Probengefäße anaerob bei 30 °C gelagert wurden.

2.1.2 Isolierung fakultativ aerober Bakterien

Insgesamt vier Flüssigkulturen sowie zwei Agarplatten (Platten 1 und 2) mit OLA- bzw. OLB-Medium wurden mit bewachsenen Polyurethanschaumkörpern bzw. Reaktorflüssigkeit angeimpft. Die Inkubation erfolgte üN bei 30 °C im Dunkeln. Flüssigkulturen wurden mit 110 rpm in einem Rotationsschüttler (Infors, Schweiz) bewegt. Ausgehend von zwei OLA- bzw. OLB-Flüssigkulturen wurden in PBS Verdünnungsreihen bis zu einer Verdünnung von 10^{-7} angelegt und sowohl auf OLA- als auch auf OLB-Platten ausplattiert. Von der OLB-Flüssigkultur wurde zusätzlich nach 8 h Inkubation ein Aliquot auf einer OLB-Platte ausplattiert. Von dieser Platte sowie von Platte 1 ausgehend wurden Einzelkolonien mit unterschiedlicher Morphologie ausgewählt und durch fraktionierten Ausstrich Reinkulturen gewonnen.

2.1.3 Isolierung anaerober Bakterien

Die Anreicherung und Isolierung anaerober Bakterien erfolgte aus Probenmaterial, das für mindestens 12 Tage bei 30 °C anaerob gelagert wurde. Alle Inkubationen erfolgten bei 30 °C im Dunkeln in Anaerobiertöpfen von Oxoid (Wesel) oder Mart (Bocholt). Ein anaerobes Milieu wurde entweder durch Zugabe von Ascorbinsäuregranulat (Anaerogen; Oxoid) oder die Begasung mit technisch reinem Stickstoff oder einem Stickstoff-Kohlendioxid-Wasserstoff-Gemisch und die Zugabe eines Platinkatalysators (Mart, Bocholt) erreicht. Bei allen Verfahren wurde das anaerobe Milieu durch Sauerstoffindikatoren von Merck (Darmstadt) oder Oxoid (Wesel) überprüft.

2.1.3.1 Isolierung nitratreduzierender Bakterien

Insgesamt drei Flüssigkulturen mit RNA-Medium wurden mit bewachsenen Polyurethanschaumkörpern angeimpft. Nach etwa zweiwöchiger Inkubation nach Anaerob-Methode II erfolgte eine erste Passagierung in RNA-Flüssigmedium (10% Inokulum). Aliquots dieser Flüssigkulturen wurden auf RNA-Platten ausplattiert und durch mehrfaches Ausstreichen von Kolonien, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Morphologie ausgewählt wurden, Reinkulturen erhalten. Nach etwa zwei Monaten Inkubation wurden alle Flüssigkulturen auf die Anwesenheit von Nitrat getestet (Nitrat-Teststäbchen; Merck, Darmstadt).

2.1.3.2 Isolierung selenatreduzierender Bakterien

Die Arbeiten zur Isolierung selenatreduzierender Bakterien erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. R. Siddiqui (Arbeitsgruppe Prof. B. Friedrich, Institut für Biologie, Humboldt Universität zu Berlin).

Insgesamt vier 50 ml Flüssigkulturen mit Se-Medium bzw. SN-Medium wurden mit je einem bewachsenen Polyurethanschaumkörpern bzw. mit 10 ml Reaktorflüssigkeit angeimpft und anaerob inkubiert. Nach fünf Tagen zeigten alle Flüssigkulturen einen rötlichen Niederschlag, der als Inokulum für weitere Flüssigkulturen mit Se-, SN- und SNS-Medium diente. Von diesen Kulturen wurden Aliquots auf Se-, SN-, SNS-, SS0.1- oder SS0.4-Platten ausgestrichen. Rot gefärbte Kolonien wurden abgeimpft und durch wiederholtes Ausstreichen auf SS0.1-, SS0.4-, S40S0.4- oder SSGY0.4-Platten Reinkulturen gewonnen. Die Wahl des Mediums richtete sich dabei nach dem Grad der Rotfärbung und dem Zellwachstum.

2.1.3.2.1 Nachweis der Reduktion von Selenat zu elementarem Selen

Der quantitative Selen-Nachweis erfolgte mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) durch Herrn Dr. Rösick (Hahn-Meitner-Institut, Berlin). Dazu wurden drei SNS0.4-Flüssigkulturen (192 ml) angesetzt anaerob inkubiert. Nach 9.5 h, 25.25 h bzw. 48.25 h wurden jeweils 10 ml der Kultur entnommen und mit 1 ml einer wässrigen 37% Formalin-Lösung (Merck, Darmstadt) versetzt. Von diesen Aliquots ausgehend wurde die OD der Kulturen bei 600 nm bestimmt (Pharmacia Photometer Ultrospec III, Freiburg). Die verbleibenden 182 ml Flüssigkultur wurden 20 min bei 2500 x g und 4 °C zentrifugiert, das überstehende Medium abgenommen und bei 4 °C gelagert. Die resultierenden Zellpellets wurden mit je 40 ml PBS gewaschen (15 min Zentrifugation bei 2500 x g, 4 °C). Nach Abgießen des ÜS wurden die Zellpellets wieder in je 8 ml PBS aufgenommen und in Polyethylen-Aufschlußröhrchen 10 min lang bei 2000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach erneutem Abgießen des ÜS wurden die bräunlichen Zellpellets bis zur AAS-Probenaufarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.2 Stammhaltung

Die Anzucht der Referenzstämme und Isolate erfolgte in Flüssigkultur oder auf Agarplatten. Für kurzfristige Lagerung wurden Platten bei 4 °C aufbewahrt. Als Dauerkulturen wurden entweder Glycerinkonserven mit mindestens 25% Glycerin oder Mikrobankkulturen (Pro-Lab, Kanada) angelegt und bei -70 °C gelagert.

2.3 Präparation von Nukleinsäuren

2.3.1 Entnahme von Bioreaktormaterial zur DNA-Präparation

Aus dem geöffneten Bioreaktor wurden mit einer sterilen Pinzette bewachsene Polyurethanschaumkörper entnommen, in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und sofort in einem mit Trocken- oder Wassereis gefüllten Thermobehälter eingefroren. Nach dem etwa 30 minütigen Transport wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert. Wurden Proben nicht innerhalb einiger Tage bearbeitet, erfolgte eine Lagerung bei -70 °C.

2.3.2 Präparation von DNA aus Bioreaktormaterial

Zur Lyse der auf den Polyurethanschaumkörpern immobilisierten Mikroorganismen und der anschließenden Präparation der Gesamt-DNA wurde die Methode von Tsai und Olson (1991) in modifizierter Form eingesetzt.

Lysozym-Lösung	3 mg/ml Lysozym 0.15 M NaCl 0.01 M EDTA
TNS-Lösung, pH 8.0	0.5 M Tris-HCl 0.1 M NaCl 10% SDS

Ein Polyurethanschaumkörper wurde in 6 ml Lysozym-Lösung bei 37 °C über 3 h inkubiert und alle 15 min leicht geschüttelt. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von 6 ml TNS-Lösung und sechsfachem Einfrieren auf Trockeneis, Auftauen für 15 min bei 65 °C und kurzem vortex-schütteln aufgebrochen. Nach Zugabe von 160 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) wurden die Proben bei 50 °C inkubiert. In dieser Zeit wurden Aliquots der Flüssigphase lichtmikroskopisch untersucht, um die Lysiseffizienz abzuschätzen. Nachdem keine typischen Zellmorphologien mehr zu erkennen waren, wurde die Flüssigphase abgezogen und jeweils einmal mit Phenol, Phenol/Chloroform (1:1) und Chloroform extrahiert. Die in der wässrigen Phase enthaltene DNA wurde durch Zugabe von 1 VT 96% Ethanol und 1/10 VT Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 4.9) bei -20 °C üN gefällt. Die gefällte DNA wurde in 2 ml Eppendorf-Gefäßen abzentrifugiert (13800 x g, 1 h, 4 °C), einmal mit 70% Ethanol gewaschen und die Pellets dann in 100 µl TE-Puffer gelöst. Um mitgefällte PCR-Inhibitoren und niedermolekulare DNA zu entfernen, wurde ein Aliquot der DNA-Präparation zusammen mit DNA-Marker II und einer Negativkontrolle (nur

Agarosegel-Probenpuffer [s. I.2.4.1]) auf ein 1%iges Agarose-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. DNA-Banden mit einer Größe von mehr als 9 kb bzw. der korrespondierende Bereich der Negativkontrolle wurden mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht (356 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und die Agaroseblöckchen sofort in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt. Um eine Kontamination der DNA-Präparation mit Fremd-DNA zu vermeiden, wurden alle für die Agarose-Gelelektrophorese erforderlichen Lösungen und Puffer frisch angesetzt und autoklaviert bzw. sterilfiltriert. Zusätzlich wurden alle Elektrophorese-Kunststoffteile mit a. dest. gespült und für mindestens 10 min UV-bestrahlt. Die Weiterbehandlung aller Agaroseblöckchen (inkl. Negativkontrolle) zur Eluierung der DNA erfolgte mit dem QiaQuick Gel Extraction Kit von Qiagen (Hilden) nach Anleitung des Herstellers.

2.3.3 Präparation von DNA aus mikrobiellen Reinkulturen

Die Präparation genomischer DNA aus Bakterien- und Archaeakulturen für spätere PCR-Amplifikationen erfolgte mittels einer Schnellmethode. Etwa eine Impföse Zellmaterial wurde in 100 µl TE-Puffer suspendiert, kurz gevortext und dann für 10 min bei 95 °C inkubiert. Nach kurzem Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurden zwischen 1 und 3 µl des ÜS direkt für die PCR eingesetzt. Die Lagerung der so präparierten DNA erfolgte bei -20 °C.

2.3.4 Präparation von Plasmid-DNA aus rekombinanten *E. coli*-Zellen (Mini-Prep)

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mittels alkalischer Lyse (Birnboim und Doly, 1979) nach dem bei Sambrook et al. (1989) aufgeführten Protokoll. Entgegen den Protokollangaben wurden alle Zentrifugationsschritte bei RT ausgeführt und auf ein Waschen des Plasmid-Pellets mit 70% Ethanol verzichtet. Alternativ zur RNase-Behandlung wurde kontaminierende *E. coli* RNA durch Fällung mit MgCl₂ entfernt (Yamamoto und Horikoshi, 1995). Dazu wurde das Plasmid-Pellet in 20 µl TE-Puffer gelöst, 2 µl einer 1 M MgCl₂-Lösung hinzugegeben und der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert. Die RNA wurde durch Zentrifugation bei 4 °C (10 min, 13800 x g) abgetrennt und der ÜS in ein neues Gefäß überführt. Bei der so präparierten Plasmid-DNA konnte auf eine nachfolgende Phenol-Extraktion verzichtet werden. Sollte Plasmid-DNA mit einem für die Sequenzierung ausreichenden

Reinheitsgrad gewonnen werden, wurden die Plasmid-Präparationen mit Ethanol gefällt, die Plasmid-DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend in TE-Puffer suspendiert. Alternativ dazu wurde Plasmid-DNA mit dem Flexiprep-Kit (Amersham-Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die nach dem letzten Präparationsschritt im Eluat verbleibenden Matrix-Partikel wurden durch Zentrifugationsfilter von Bio-101 (über Dianova, Hamburg) entfernt.

2.3.5 Präparation von Nukleinsäuren aus rekombinanten *E. coli*-Zellen für die Slot-Blot Hybridisierung (Colony Slot-Blot)

Für die Slot-Blot Hybridisierung wurden rekombinante *E. coli*-Zellen mittels alkalischer Lyse aufgebrochen, die Zelllysate verdünnt und dann aufgetragen. Dazu wurden rekombinante *E. coli*-Zellen in 96-Loch Mikrotiterplatten (Nunc, Dänemark) in je 200 µl TB-Medium (mit 50 µg/ml Ampicilin) üN bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten 15 min bei 4 °C mit 80 x g zentrifugiert, das überstehende Medium abgenommen und die Zellpellets mit je 60 µl vorgewärmter (37 °C) Denaturierungs-Lösung (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl, 0.1 % SDS) versetzt. Nach mehrmaligem Durchmischen wurden je 25 µl des Lysates in eine neue 96-Loch Mikrotiterplatte mit je 200 µl Denaturierungs-Lösung überführt. Nach erneutem Mischen wurden 60 µl dieses Ansatzes für die Slot-Blot Hybridisierung eingesetzt.

2.4 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

2.4.1 Agarosegele

Die Analyse von DNA-Fragmenten erfolgte elektrophoretisch in horizontalen Agarosegelen. In der Regel wurden Agarosekonzentrationen zwischen 1 und 2%, je nach Größe des aufzutrennenden Fragmentbereiches, verwendet. Zur Anfärbung der Nukleinsäuren wurden 100 ml Agarose-Lösung vor dem Erstarren 1µl einer Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml, Merck) zugegeben.

Zusammensetzung des Agarosegel-Probenpuffers:

1.5 g Ficoll
25 mg Bromphenolblau
25 mg Xylencyanol FF
ad 10 ml a. dest.

Die Proben wurden mit 0.6-1 VT Agarosegel-Probenpuffer gemischt und in die Taschen des Agarosegels überführt. Als Längenmarker wurden je nach aufzutrennendem Fragmentbereich DNA-Marker II (Fragmente über 6 kb), DNA-Marker III (Fragmente zwischen 3 und 1 kb) und DNA-Marker XIV (Fragmente zwischen 1 kb und 300 bp) mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei Spannungen zwischen 7.5-10V/cm in 1x TBE-Puffer. Anschließend wurden die Gele mittels eines UV-Transilluminators (Chromato VUE Model ST-20) ausgewertet und mit einer Polaroidkamera fotografiert. Als Filmmaterial diente Polaroidfilm Type 665. Alternativ wurden die Gele mit dem Eagle Eye Videodokumentationssystem der Firma Stratagene (Heidelberg) ausgewertet.

2.4.2 Polyacrylamidgele

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente von Sequenzierreaktionen wurden 0.25 mm starke, senkrechte Polyacrylamidgele verwendet.

Zusammensetzung der Gellösungen und des Probenpuffers:

Polyacrylamidgel 4%, 66 cm:

5 ml	Rapid Gel XL 40% Solution (Amersham-Pharmacia, Freiburg)
21 g	Harnstoff
6 ml	10x TBE (für Sequenzierung)
0.5 ml	DMSO
ad 50 ml	a. dest.

Polyacrylamidgel 6%, 45 cm:

Wie oben jedoch mit 6 ml Long Ranger Gel 50% Solution (Biozym, Hess.- Oldendorf)

PAA-Probenpuffer:

9.5 ml	Formamid
0.4 ml	500 mM EDTA-Lösung
5 mg	Bromphenolblau
5 mg	Xylencyanol FF
0.1 ml	a. dest.

Nach dem Lösen der Komponenten wurden die Gellösungen filtriert (0.45 µm Porenweite) und unmittelbar vor dem Gießen mit TEMED und APS-Lösung (10%) versetzt:

Polyacrylamidgel 6%, 30 ml für 45 cm: 24 µl TEMED und 240 µl 10%iges APS

Polyacrylamidgel 4%, 50 ml für 66 cm: 30 µl TEMED und 292 µl 10%iges APS

2.5 Quantitative Analyse von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von DNA erfolgte durch visuellen Abgleich einer Verdünnungsreihe mit einer definierten Menge DNA-Standard auf einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel.

2.6 In-vitro Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die in-vitro Amplifikation von DNA erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) entweder mit dem Omni-Cycler von Hybaid (über MWG-Biotech, Ebersberg) oder mit dem Trioblock von Biometra (Göttingen).

Zusammensetzung der Puffer und PCR-Reaktionsansätze:

10x Tricin-Puffer, pH 8.4 (Barns et al., 1994):

300 mM Tricin
500 mM KCl

PCR-Ansatz:

5 µl	10x PCR-Puffer (Gibco, Eggenstein) oder 10x Tricin-Puffer
1 µl (je 200 µM)*	dNTP-Mix (Boehringer Mannheim)
0.5 µl (2.5 U)	Ampli Taq DNA-Polymerase (Perkin-Elmer, Weiterstadt)
1.5-4 µl (1.5-4 mM)	MgCl ₂ -Lösung (Gibco, Eggenstein)
1 µl (0.3-0.5 µM)	Strang-Primer
1 µl (0.3-0.5 µM)	Gegenstrang-Primer
5 µl (5%)	Acetamid-Lösung (nur bei Tricin-Puffer)
1-10 µl	Template DNA
ad 50 µl	Ampuwa-Wasser (Fresenius, Bad Homburg)

* In Klammern angegeben ist die jeweilige Konzentration im PCR-Reaktionsansatz (Endkonzentration).

In der Regel wurde ein sog. „Hot-Start“ durchgeführt, d. h. alle Reagenzien bis auf die Ampli Taq DNA-Polymerase wurden zusammengegeben, mit 50 µl Mineralöl (Sigma) überschichtet, kurz abzentrifugiert und die PCR gestartet. Nach der initialen Denaturierungsphase wurde die Ampli Taq DNA-Polymerase durch die Ölschicht zum Reaktionsgemisch gegeben. Bei jedem PCR-Ansatz wurde als Negativkontrolle ein Reaktionsansatz ohne Template-DNA mitgeführt. Eine qualitative Kontrolle der PCR erfolgte durch Agarosegelelektrophorese eines Aliquots (5 µl) des Ansatzes.

2.6.1 PCR-Amplifizierung der 16S-rDNA aus Bakterien-Reinkulturen

Die PCR-Amplifizierung der nahezu vollständigen 16S-rDNA aus präparierter Bakterien-DNA erfolgte mit den Primerkombinationen TPU1/RTU8 oder TPU1-M13F/RTU8-M13R. Die Reaktionen enthielten 1x PCR-Puffer (Gibco, Eggenstein) und MgCl_2 -Konzentrationen von 1.5 oder 2 mM. Folgendes Reaktionsprofil wurde verwendet:

1 Zyklus	Initiale Denaturierung	98 °C	30 s
	Denaturierung	93 °C	3 min
28 Zyklen	Denaturierung	93 °C	1 min
	Primer-Hybridisierung	53 °C	1 min
	Primer-Elongation	72 °C	2 min
1 Zyklus	Primer-Elongation	72 °C	7 min

2.6.2 PCR-Amplifizierung der 16S-rDNA aus Archaea-Reinkulturen

Die PCR-Amplifizierung der nahezu vollständigen 16S-rDNA aus präparierter Archaea-DNA erfolgte mit der Primerkombination 10-30Fa-M13F/RTU8-M13R. Die Reaktionen enthielten 1x Tricin-Puffer mit 5% Acetamid (Barns et al., 1994) und 1.5 oder 2 mM MgCl_2 . Folgendes Reaktionsprofil wurde verwendet:

1 Zyklus	Initiale Denaturierung	94 °C	6 min
26 Zyklen	Denaturierung	92 °C	1 min
	Primer-Hybridisierung	50 °C	1 min
	Primer-Elongation	72 °C	2 min
1 Zyklus	Primer-Elongation	72 °C	7 min

2.6.3 PCR-Amplifizierung von 16S-rDNA aus Konsortiums-DNA

Für die Anlage von rDNA Genbibliotheken aus Bioreaktormaterial erfolgte die PCR-Amplifizierung nahezu vollständiger bakterieller 16S-rDNA sowie partieller Euryarchaeota-16S-rDNA aus präparierter Gesamt-DNA. Insgesamt wurden je nach

verwendeter Primerkombination und Reaktionsprofil vier verschiedene PCR-Ansätze gewählt, die in Tabelle II.2.6.3.1 aufgelistet sind. Die Ansätze A und B enthielten 1x PCR-Puffer (Gibco, Eggenstein) und 2 mM MgCl₂, wohingegen die Ansätze C und D 1x Tricin-Puffer, 5% Acetamid und 1.5 mM MgCl₂ enthielten. Für alle PCR-Ansätze wurde die Template-DNA austitriert, um die für maximale Produktbildung notwendige Konzentration zu bestimmen. Um eine DNA-Kontamination während der Gelpräparation (s. II.2.3.2) zu überprüfen, wurden bei den PCR-Ansätzen A und C neben der üblichen Negativkontrolle (ohne Template DNA) auch Reaktionen mitgeführt, die ein Aliquot des Eluats der Gel-Negativkontrolle enthielten.

Tab. II.2.6.3.1 Primerkombinationen und Reaktionsprofile unterschiedlicher PCR-Typen für die Amplifizierung von 16S-rDNA aus Konsortiums-DNA.

PCR-Typ	Primerpaar	Spezifität	Reaktionsprofil
A	TPU1 RTU8	Bakterien	98 °C, 3 min 93 °C, 3 min 28x (93 °C, 1 min; 53 °C, 1 min; 72 °C, 3 min) 72 °C, 7 min
B	LIC-TPU1 LIC-RTU8	Bakterien	98 °C, 2 min 93 °C, 1 min 28x (93 °C, 1 min; 53 °C, 1 min; 72 °C, 5 min) 72 °C, 7 min
C	10-30Fa 1390Ra	Euryarchaeota	94 °C, 6 min 30x (92 °C, 1.5 min; 50 °C, 1.5 min; 72 °C, 2 min) 72 °C, 7 min
D	357Fa 1390Ra	Euryarchaeota	94 °C, 6 min 27x (92 °C, 1.5 min; 50 °C, 1.5 min; 72 °C, 4 min) 72 °C, 7 min

2.6.4 PCR-Amplifizierung von *nifH*-Genfragmenten aus Konsortiums-DNA

Für die Anlage von *nifH* Genbibliotheken aus Bioreaktormaterial erfolgte die PCR-Amplifizierung etwa 390 bp langer, partieller *nifH*-Sequenzen aus präparierter Gesamt-DNA. Die PCR wurde mit der Primerkombination 19F/407R, 1x PCR-Puffer (Gibco, Eggenstein) und 4 mM MgCl₂ nach folgendem Reaktionsprofil durchgeführt:

1 Zyklus	Initiale Denaturierung	98 °C	3 min
	Denaturierung	93 °C	3 min
25 Zyklen	Denaturierung	93 °C	1 min
	Primer-Hybridisierung	50 °C	2 min
	Primer-Elongation	72 °C	2 min
1 Zyklus	Primer-Elongation	72 °C	10 min

Für alle PCR-Reaktionen wurde die Template-DNA austitriert, um die für maximale Produktbildung notwendige Konzentration zu bestimmen. Aliquots der PCR-Reaktionen (25 µl) wurden auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, DNA-Banden von etwa 390 bp Länge mit einem sterilen Skalpell unter UV-Bestrahlung ausgeschnitten und in ein steriles Gefäß überführt. Die Weiterbehandlung der Agaroseblöckchen zur Eluierung der DNA erfolgte mit dem QiaQuick Gel Extraction Kit von Qiagen (Hilden) nach Anleitung des Herstellers.

2.6.5 PCR-Amplifizierung klonierter DNA

Um die Insertlänge rekombinanter Plasmide zu ermitteln, sowie zur weiteren Analyse klonierter 16S-rDNA (Hybridisierung und Sequenzierung) wurden Inserts mit den an flankierende Plasmidbereiche bindenden Primern M13(40)F und M13(24)R aus dem entsprechenden Plasmid-Vektor amplifiziert. Die PCR-Reaktionen erfolgten mit 1x PCR-Puffer (Gibco, Eggenstein), 1.5 oder 2 mM MgCl₂ ohne „Hot-Start“ nach folgendem Reaktionsprofil:

1 Zyklus	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
29 Zyklen	Denaturierung	92 °C	1 min
	Primer-Hybridisierung	53 °C	1 min
	Primer-Elongation	72 °C	1-2 min*
1 Zyklus	Primer-Elongation	72 °C	5 min

* Die Primer-Elongationszeit wurde je nach der Länge des erwarteten Inserts variiert.

Als Template-DNA diente entweder 1 µl einer 1:100 in TE-Puffer verdünnten Plasmid-Präparation. Alternativ wurden rekombinante *E. coli*-Zellen direkt mit einem sterilen Zahnstocher in den PCR-Reaktionsansatz gegeben. Bei der nachfolgenden Kontrolle der Reaktionen mittels Agarosegelelektrophorese wurde berücksichtigt, daß die PCR-Produkte aufgrund der mitamplifizierten flankierenden Plasmidbereiche eine größere Länge gegenüber der ursprünglich eingesetzten DNA aufwiesen.

2.6.6 PCR-Amplifizierung und DIG-Markierung von 16S-rDNA-Fragmenten

Die Herstellung Digoxigenin(DIG)-markierter 16S-rDNA-Polynukleotidsonden erfolgte in zwei aufeinander folgenden PCR-Reaktionen mit verschachtelten Primerkombinationen, einer sog. „nested-PCR“, um eine Ko-Amplifikation kontaminierender *E. coli*-16S-rDNA zu vermeiden. In der ersten PCR wurde klonierte 16S-rDNA wie unter II.2.6.5 beschrieben aus dem Plasmid-Vektor amplifiziert. Ein Aliquot dieser PCR-Reaktion (1 µl) wurde 1:1000 in TE-Puffer verdünnt und als Template-DNA für eine zweite PCR mit den 16S-rDNA spezifischen Primern TPU1 und RTU2 eingesetzt. In diesem Ansatz wurde der dNTP-Mix (Boehringer Mannheim) gegen ein Gemisch der vier Nukleotide ausgetauscht, das zusätzlich DIG-11-dUTP enthielt (DIG-PCR-Mix).

Zusammensetzung des DIG-PCR-Mix:

12.5 µl (10 µM)*	alkalistabiles DIG-11-dUTP (200 µM, Boehringer Mannheim)
47.5 µl (190 µM)	dTTP (1 mM)
je 5 µl (je 200 µM)	dATP, dCTP, dGTP (je 10 mM)

* In Klammern angegeben ist die jeweilige Konzentration im Reaktionsansatz (Endkonzentration).

Die Amplifikation erfolgte in einem Volumen von 25 µl mit 1x PCR-Puffer (Gibco, Eggenstein), 7.5 µl DIG-PCR-Mix und 2 mM MgCl₂ nach folgendem Reaktionsprofil:

1 Zyklus	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
28 Zyklen	Denaturierung	92 °C	1 min
	Primer-Hybridisierung	60 °C	1 min
	Primer-Elongation	72 °C	1 min
1 Zyklus	Primer-Elongation	72 °C	5 min

Ein Aliquot des Reaktionsansatzes (3.5 µl) wurde ohne weitere Aufreinigung für die Hybridisierung eingesetzt .

2.6.7 Direkte Aufreinigung PCR-amplifizierter DNA

Die direkte Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit einer auf Silika als DNA-bindender Matrix basierenden Methode (Boyle und Lew, 1995).

Zusammensetzung der Lösungen:

Silika-Suspension: 2.5 g Silika (Sigma, 2 mal in 25 ml PBS-Puffer gewaschen)
 25 ml NaI (3 M)

Waschpuffer: 50 mM NaCl
 10 mM Tris, pH 7.5
 2.5 mM EDTA

in 25 ml a. dest. lösen und 25 ml Ethanol zugeben

Der PCR-Reaktionsansatz wurde vom Mineralöl getrennt, mit 2 VT einer 6 M NaI-Lösung versetzt und 12 µl der Silika-Suspension zugegeben. Nach kurzem vortex-schütteln wurden die Ansätze 10 min bei RT inkubiert, dann kurz zentrifugiert und der ÜS abgegossen. Das Silika-Pellet wurde anschließend zweimal in jeweils mindestens 200 µl Waschpuffer gewaschen und in einer dem ursprünglichen PCR-Reaktionsansatz entsprechenden Menge TE-Puffer für 10 min bei 37 oder 55 °C eluiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Eluat abgenommen und verbleibende Silikapartikel mit einem Zentrifugationsfilter von Bio-101 (über Dianova, Hamburg) abgetrennt. Die Lagerung der so aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte bei -20 °C.

2.7 Klonierung PCR-amplifizierter DNA

2.7.1 TA-Klonierung

Die TA-Klonierung basiert auf dem sequenzunabhängigen Anhang eines Adenosins am 3'-Ende der synthetisierten DNA durch thermostabile DNA-Polymerasen ohne 3'→5' Exonukleaseaktivität (z. B. *AmpliTa*qDNA-Polymerase). Dies erlaubt die Ligation mit einem linearisierten Vektor-Plasmid das einen einfachen Tyrosin-Überhang aufweist.

Für diese Klonierungen wurde der TA-Cloning Kit von Invitrogen (de Schelp, Niederlande) mit den Plasmid-Vektoren pCRII oder pCR2.1 verwendet. Beide Vektoren unterscheiden sich lediglich durch eine 42 bp lange Sp6-Promoter Bindungsstelle. Alternativ wurde der mit dem pCR2.1 Vektor identische pT-Adv Vektor des AdvanTAge PCR Cloning Kit von Clontech (Heidelberg) eingesetzt. Nach Empfehlung der Hersteller wurden frische (max. 24 h), nicht aufgereinigte PCR-Produkte für die Ligation eingesetzt. Bei der Ligation PCR-amplifizierter *nifH*-Genfragmenten führte dieses Vorgehen zunächst zur Klonierung kürzerer, unspezifischer Fragmente, so daß in diesem Fall ausschließlich gelaufgereinigte PCR-Produkte zur Verwendung kamen (s. II.2.6.4). Alle weiteren Arbeitsschritte sowohl der Ligation als auch der nachfolgenden Transformation von *E. coli*-Zellen (INV α F' oder TOP10F') wurden entsprechend den Angaben der Hersteller durchgeführt.

2.7.2 LIC-Klonierung

Die LIC-Klonierung (Ligation-Independent-Cloning) basiert auf komplementären, einzelsträngigen Überhängen am 3'-Ende des PCR-Produktes und des linearisierten Vektors (z.B. pUC19), die durch eine spezifische T4-DNA-Polymerase Behandlung generiert werden. Bei ausreichender Länge dieser Einzelstränge bildet sich ohne Ligation eine stabile Verbindung zwischen PCR-Produkt und Vektor aus, die für eine Transformation von *E. coli*-Zellen geeignet ist (Aslanidis und de Jong, 1990; Aslanidis et al., 1994).

2.7.2.1 Präparation des PCR-Produktes

Für die LIC-Klonierung wurde mit der Primerkombination LIC-TPU1/LIC-RTU8 amplifizierte 16S-rDNA eingesetzt (Tab. II.2.7.3.1, PCR-Ansatz B). Eine Aufreinigung

eines Aliquots der PCR-Reaktion (20 µl) erfolgte mit der beschriebenen Silika-Methode. Dabei erfolgte die Inkubation mit der Silika-Matrix für 10 min bei 4 °C und das Silika-Pellet wurde dreimal mit je 100 µl Waschpuffer gewaschen. Nach der Elution wurden verbleibende Silika-Partikel jedoch nicht durch einen Zentrifugationsfilter abgetrennt.

2.7.2.2 Präparation des Plasmid-Vektors

Um die für die LIC-Klonierung notwendigen Nukleotidsequenzen in pUC19 Plasmid-DNA einzuführen, wurde *Xba*I geschnittene pUC19 DNA mit den Primern PDJ8012 und PDJ8112 PCR-amplifiziert.

2.7.2.2.1 Restriktionsverdau von pUC19 mit *Xba*I

Der Restriktionsverdau erfolgte für 30 min bei 37 °C in einem Volumen von 20 µl mit 100 ng pUC19, 15 Units *Xba*I (Boehringer Mannheim) und 1x *Xba*I-Restriktionspuffer (Boehringer Mannheim). Zum Abstoppen der Reaktion wurden 80 µl a. dest. hinzugefügt und der Ansatz 10 min bei 95 °C inkubiert.

2.7.2.2.2 PCR-Amplifizierung linearisierter pUC19-DNA

Linearisierte, *Xba*I-geschnittene pUC19-DNA (1 ng) wurde mit den Primern PDJ8012 und PDJ8112 in einem PCR-Ansatz mit 1x PCR-Puffer (Gibco, Eggenstein) und 1.5 mM MgCl₂ nach folgendem Reaktionsprofil amplifiziert:

1 Zyklus	Initiale Denaturierung	94 °C	5 min
28 Zyklen	Denaturierung	93 °C	1 min
	Primer-Hybridisierung	60.8 °C	1 min
	Primer-Elongation	72 °C	3 min
1 Zyklus	Primer-Elongation	72 °C	5 min

Die Aufreinigung des halben PCR-Ansatzes (25 µl) erfolgte nach der Silika-Methode.

2.7.2.3 T4-DNA-Polymerase Behandlung

Für die Generierung einzelsträngiger DNA-Überhänge an PCR-amplifizierter 16S-rDNA (16S-rDNA-PCR) bzw. Vektor (pUC19-PCR) erfolgte eine T4-DNA-Polymerase Behandlung in Gegenwart von dGTP bzw. dCTP. Die 50 µl-Ansätze enthielten

jeweils 16 µl aufgereinigter 16S-rDNA-PCR bzw. 23 µl pUC19-PCR, 2 Units T4-DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim), 1x T4-DNA-Polymerase Reaktionspuffer (Boehringer Mannheim), 500 µM dGTP (bei 16S-rDNA PCR-Produkt) bzw. dCTP (bei pUC19-PCR). Nach 20 min Inkubation bei 37 °C wurden die Ansätze für 10 min auf 65 °C erhitzt, erneut mit Silika aufgereinigt und in TE-Puffer eluiert.

2.7.2.4 Klonierung und Transformation

In einem Volumen von 20 µl (TE-Puffer) wurde 10 ng T4-DNA-Polymerase behandelte pUC19-DNA mit 80 ng T4-DNA-Polymerase behandelter PCR-amplifizierter 16S-rDNA (molares Verhältnis 1:13) vermischt und 25 min bei RT inkubiert. Aliquots dieses Ansatz wurden direkt zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen (Epicurian Coli SURE competent cells, Stratagene, Heidelberg) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Jeweils 1 bzw. 10 µl des Klonierungsansatzes wurden zu je 100 µl vorbehandelten (25 mM Mercaptoethanol, 10 min auf Eis), kompetenten *E. coli*-Zellen gegeben, für 30 min auf Eis inkubiert und die Ansätze einem Hitzeimpuls von 42 °C für exakt 45 s ausgesetzt. Nach erneuter Inkubation auf Eis (2 min) wurden jeweils 900 µl auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium zu den Zellen gegeben und die Ansätze für 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator (225 rpm) bewegt. Aliquots der Zellsuspension wurden anschließend auf Agarplatten mit TAXI-Medium ausplattiert und mindestens 16 h bei 37 °C inkubiert. Nach 2-3 h Lagerung der Platten bei 4 °C wurden weiße Kolonien mit sterilen Zahnstochern auf neue Agarplatten mit TAXI-Medium überimpft.

2.7.3 Anlage von 16S-rDNA Genbibliotheken aus Konsortiums-DNA

Insgesamt wurden acht verschiedene 16S-rDNA Genbibliotheken aus Konsortiums-DNA angelegt. Diese Genbibliotheken unterschieden sich in den PCR-Ansätzen, der für die PCR eingesetzten Template-DNA und der Klonierungsmethode.

Tab. II.2.7.3.1 PCR-Ansätze, Template-DNA und Klonierungsmethoden der 16S-rDNA Genbibliotheken.

PCR-Ansatz/16S-rDNA Genbibliothek*	PCR-Typ**	Template-DNA für PCR***	Klonierungsmethode****
A	A	31.1.95	TA, pCRII
B	B	31.1.95	LIC, pUC19
C	C	31.1.95	TA, pCRII
D	D	31.1.95	TA, pCR2.1
E	A	2.12.96	TA, pT-Adv
F	A	9.12.96	TA, pT-Adv
G	A	16.12.96	TA, pT-Adv
H	A	23.12.96	TA, pT-Adv

* Bei Genbibliothek G mußte das PCR-Produkt durch Ethanolfällung und Suspension in 5 µl TE-Puffer um den Faktor 10 konzentriert werden.

** Zur Beschreibung des PCR-Typs s. Tab. II.2.6.3.1.

*** Angegeben ist das Datum der Probennahme für die DNA-Extraktion. Alle Präparationen erfolgten wie unter II.2.3.2 angegeben.

**** Neben der Klonierungsmethode ist der jeweilige Plasmid-Vektor angegeben.

2.7.4 Anlage von *nifH*-Genbibliotheken aus Konsortiums-DNA

Insgesamt wurden ausgehend von drei verschiedenen DNA-Präparationen drei *nifH*-Genbibliotheken aus Konsortiums-DNA angelegt (X, Y, Z). Alle *nifH*-Genbibliotheken wurden nach PCR-Amplifizierung von *nifH*-Genfragmenten aus präparierter Konsortiums-DNA und anschließender TA-Klonierung mit dem Vektor pCR2.1 angelegt.

Tab. II.2.7.4.1 Aus Konsortiums-DNA angelegte *nifH*-Genbibliotheken.

<i>nifH</i> -Genbibliothek	Template-DNA*
X	2.12.96
Y	9.12.96
Z	23.12.96

* Angegeben ist das Datum der Probennahme für die DNA-Extraktion. Alle Präparationen erfolgten wie unter II.2.3.2 angegeben.

2.8 DIG-Markierung von Oligonukleotiden

Die enzymatische Markierung von Oligonukleotiden mit Digoxigenin (DIG) erfolgte mit dem „DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit“ (Boehringer, Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Die Oligonukleotide wurden dabei durch das Enzym Terminale Transferase am 3'-Ende durch Einbau eines DIG-gekoppelten ddUTP (DIG-ddUTP) markiert. Für jede Reaktion wurden je 100 pmol Oligonukleotid eingesetzt. Zur Überprüfung der Markierungsausbeute wurden Verdünnungsreihen des Reaktionsproduktes und eines DIG-markierten Standardoligonukleotids (Boehringer Mannheim) verglichen. Dies erfolgte durch Erstellen einer Dot-Blot Membran und den nachfolgenden Nachweis der DIG-markierten DNA mittels Chemolumineszenz.

2.9 Sequenzierung von DNA

Als DNA-Sequenzierungsmethode wurde die zyklische- oder PCR-Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Primern eingesetzt. Neben den universellen Sequenzierprimern M13(20)F, M13(21)F und M13(24)R wurden für die Sequenzierung von 16S-rDNA die spezifischen Strangprimer TPU1, TPU2, TPU5 und 1114F sowie die Gegenstrangprimer RTU2, RTU3, RTU5, RTU6, Arch915 und 1100R eingesetzt. Die Synthese der Oligonukleotide und Markierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte durch MWG-Biotech (Ebersberg). Alle Reaktionen wurden mit dem Thermosequense Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham-Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Als Template dienten sowohl mit dem Flexi-Prep Kit (Amersham-Pharmacia, Freiburg) aufgereinigte Plasmid-DNA als auch mit Silika aufgereinigte PCR-Produkte. Ein Reaktionsansatz (8 µl) enthielt 2 µl A, T, G oder C-Reagenz, 4 pmol fluoreszenzmarkierten Primer, 0.2-1 µg Template-DNA und 1-1.5% DMSO. Nachdem die Ansätze mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet worden waren erfolgte die Sequenzierreaktion entweder mit dem Omni-Cycler von Hybaid (über MWG-Biotech, Ebersberg) oder mit dem Trioblock (Biometra, Göttingen) nach folgendem Reaktionsprofil:

1 Zyklus	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
30 Zyklen	Denaturierung	95 °C	30 s
	Primer-Hybridisierung	55 °C	30 s
	Primer-Elongation	70 °C	1 min

Entgegen den Angaben des Herstellers wurden die Sequenzierungsansätze ohne weitere Aufreinigung unmittelbar nach dem Ablauf der Reaktion mit 6 µl PAA-Probenpuffer versetzt und ein Aliquot (1.4 oder 2 µl) auf ein 6 oder 4%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Analyse der Sequenzierprodukte erfolgte mit dem automatischen LI-COR 4000 oder 4000L DNA-Sequenzierer (MWG-Biotech, Ebersberg).

2.10 Vergleichende 16S-rDNA Sequenzanalyse

Die Bearbeitung der ermittelten 16S-rDNA Sequenzen und das Alignment mit bekannten 16S rRNA Sequenzen erfolgte mit dem ARB_EDIT-Sequenzeditor des ARB Programm Pakets (<http://isar.mpi-bremen.de/arb/arb.html>), das auf einem Sparc 5 UNIX Computer installiert wurde. Vollständige 16S-rDNA Sequenzen (etwa 1550 bp) wurden mit dem BlastN-Programm der WWW-Version des HUSAR-Programm Pakets (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de:8080/menu>) mit den in den öffentlichen Datenbanken hinterlegten Sequenzen (Stand März 1998) verglichen, um ihre ungefähre phylogenetische Zuordnung zu bestimmen. Phylogenetisch verwandte Sequenzen, die nicht in der ARB-Datenbank mit ihren etwa 8000 vollständigen oder partiellen 16S rRNA Sequenzen enthalten waren, wurden mit dem ARB_PARSIMONY-Programm ohne Veränderung des Verzweigungsmusters in einen phylogenetischen Baum eingefügt, der auf 5106 16S rRNA Sequenzen mit mindestens 1400 bp Länge basierte. Davon ausgehend wurden mit dem ARB-Programm phylogenetische Bäume nach der "Neighbor-joining" Methode (Saitou und Nei, 1987) und der Korrekturformel nach Jukes und Cantor (1969) errechnet, denen ein verringerter Datensatz zu Grunde lag.

Die Zuverlässigkeit des Verzweigungsmusters wurde mit der "Bootstrap" Analyse (Felsenstein, 1985) bestimmt. Um mögliche Sequenzchimären unter den Klonen nachzuweisen, wurden ausgehend von jeweils überlappenden Sequenzen von etwa 400 bp Länge phylogenetische Bäume verglichen. Zusätzlich wurden alle in dieser Arbeit ermittelten vollständigen 16S-rDNA Sequenzen, die weniger als 96% Homologie zu den 16S rRNA Sequenzen bekannter Mikroorganismen aufwiesen mit dem CHECK_CHIMERA-Programm des "Ribosomal Database Projektes" (Larsen et al., 1993) auf eine mögliche chimäre Struktur untersucht.

2.11 Vergleichende Sequenzanalyse abgeleiteter *nifH*-Genprodukte (NifH-Sequenzen)

Ausgehend von den ermittelten Sequenzen partieller *nifH*-Gene wurde mit dem Programm TRANSLATE der WWW-Version des HUSAR-Programm Pakets (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de:8080/menu>) die Aminosäuresequenz des kodierten NifH-Proteins abgeleitet und diese dann mit dem BlastP-Programm (HUSAR-Paket) mit den in den öffentlichen Datenbanken hinterlegten Aminosäuresequenzen verglichen. Das Alignment mit verwandten Proteinsequenzen erfolgte manuell mit dem ARB_EDIT-Sequenzeditor des ARB-Programm Pakets (<http://isar.mpi-bremen.de/arb/arb.html>). Ausgehend von diesem Alignment wurde mit dem ARB-Programm und der Dayhoff PAM Matrix Option eine evolutionäre Unähnlichkeitsmatrix errechnet aus der dann wiederum mit der "Neighbor-joining" Methode (Saitou und Nei, 1987) ein phylogenetischer Baum abgeleitet wurde. Mit dem Programm PROTPARS des PHYLIP-Programm Pakets (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) wurde ein phylogenetischer Baum nach der Parsimony-Methode (Felsenstein, 1978) ermittelt. Für alle phylogenetischen Dendrogramme wurde die Zuverlässigkeit des Verzweigungsmusters mittels „Bootstrap“-Analyse ermittelt (Felsenstein, 1985).

2.12 Filter-Hybridisierungen

2.12.1 Dot-Blot

Der DNA-Transfer auf das Trägermaterial (Hybond N Nylonmembran; Amersham-Pharmacia, Freiburg) fand beim Dot-Blot durch einfaches „Aufpipettieren“ statt. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben (1 µl Plasmid-DNA oder PCR-Produkt) durch 3 min Inkubation bei 95 °C denaturiert und rasch auf Eis abgekühlt. Nach dem Auftragen der Proben wurden die Membranen von beiden Seiten je 2 min auf einem „UV-crosslinker“ (312 nm) von MWG-Biotech (Ebersberg) bestrahlt und die Nukleinsäuren so durch UV-Quervernetzung fixiert.

2.12.2 Slot-Blot (Colony-Slot-Blot)

Beim Slot-Blot wurden die DNA-Proben nicht punktförmig sondern mit Hilfe einer speziellen Vakuumapparatur, dem sog. Slot-Blotter, schlitzförmig aufgetragen. In dieser Arbeit wurde der Minifold II Apparat der Firma Schleicher und Schuell (Dassel)

verwendet, der das Auftragen von 72 Proben auf das Trägermaterial (Hybond N+ Nylonmembran; Amersham-Pharmacia, Freiburg) erlaubt. Nach dem Durchsaugen der Proben wurden je 200 µl 2x SSC-Lösung in die Probenvertiefungen gegeben und ebenfalls durchgesaugt. Die aufgetragenen Nukleinsäuren wurden durch UV-Quervernetzung (2 mal je 3 min) auf der Membran fixiert. Durch anschließendes Waschen in 0.1x SSC-Lösung (2 mal je 30 min bei 68 °C) wurden auf der Membran verbleibende Zelltrümmer, die bei der nachfolgenden Hybridisierung zu unspezifischen Signalen hätten führen können, entfernt.

2.12.3 Hybridisierung mit DIG-markierten DNA-Sonden

Für die Analyse rekombinanter *E. coli*-Klone wurden die mittels Dot-Blot oder Slot-Blot Verfahren auf Nylon-Membranen gebrachten DNA-Proben mit DIG-markierten Oligo- oder Polynukleotidsonden hybridisiert.

Zusammensetzung der Puffer und Lösungen:

Standard-Hybridisierungs-Puffer:

- 5x SSC
- 0.1% Natrium-Lauroylsarkosin
- 0.02% SDS
- 1% Blockierungsreagenz (Boehringer Mannheim) in Puffer 1 (s. u.) gelöst

Standard-Hybridisierungs-Puffer mit 50% Formamid (SHF-50 Puffer):

- 5x SSC
- 0.1% Natrium-Lauroylsarkosin
- 0.02% SDS
- 2% Blockierungsreagenz (Boehringer Mannheim) in Puffer 1 (s. u.) gelöst
- 50% deionisiertes Formamid (Biometra, Göttingen)

Waschlösung 1:

- 0.1x SSC
- 0.1% SDS

Waschlösung 2:

- 6x SSC
- 0.1% SDS

Alle Schritte erfolgten in Hybridisierungsröhren von MWG-Biotech (Ebersberg) mit einem Ofen der gleichen Firma. Zunächst wurden die Membranen (max. 150 cm²/Röhre) für 30 min bei der jeweiligen Hybridisierungstemperatur mit etwa 25 ml Standard-Hybridisierungs-Puffer prähybridisiert. Für die Hybridisierung mit DIG-markierten 16S-rDNA-Fragmenten wurde anstelle des Standard-Hybridisierungs-Puffer 20 ml SHF-50 Puffer verwendet (20 ml mit 3.5 µl einer 25 µl-DIG-PCR-Reaktion). Zur Denaturierung der rDNA-Fragmente wurde der Hybridisierungsansatz

zuvor für 10 min bei 68 °C inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte anschließend für 4 h bei Temperaturen zwischen 59 und 62 °C. Nach Abgießen des SHF-50 Puffers wurden die Membranen zweimal mit je 40 ml Waschlösung 1 bei 68 °C für je 25 min gewaschen.

Für die Hybridisierung mit DIG-markierten Oligonukleotiden wurde der Standard-Hybridisierungs-Puffer nach der Prähybridisierung gegen Standard-Hybridisierungs-Puffer mit 10 pmol DIG-markiertem Oligonukleotid ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte bei 37 °C für mindestens 1.5 h. Anschließend wurden die Membranen zweimal für je 15 min bei Temperaturen zwischen 52 und 54 °C mit etwa 25 ml Waschlösung 2 gewaschen.

Der Nachweis gebundener DIG-markierter DNA erfolgte über einen Enzym-Immunoassay mit Chemolumineszenz (DIG Luminescent Detection Kit; Boehringer Mannheim). Alle Arbeitsschritte wurden bei 37 °C durchgeführt.

Zusammensetzung der Detektionspuffer und Lösungen:

Puffer 1, pH 7.5:

0.1 M Maleinsäure
0.15 M NaCl

Puffer 2:

1% Blockierungsreagenz in Puffer 1 gelöst

Puffer 3, pH 9.5:

0.1 M Tris-HCl
0.1 M NaCl

Substratlösung:

20-40 µl CSPD auf 10 ml Puffer 3

Stripping-Lösung A:

0.2 N NaOH
0.1% SDS

Stripping-Lösung B:

50% Formamid (deionisiert)
10 mM NaH₂PO₄, pH 6.5

Die Membranen wurden nach dem letzten Waschschrift 30 min mit 20 ml Puffer 2 inkubiert. Nach Verdünnung des Antikörpers (Anti-DIG-AP-Konjugat; 2µl auf 25 ml Puffer 2) wurden die Membranen 30 min lang mit dieser Lösung inkubiert. Nach Abgießen der Antikörperlösung wurden die Membranen zweimal je 15 min mit je 25 ml Puffer 1 gewaschen, kurz mit 5 ml Puffer 3 äquilibriert und dann für 15 min mit Substratlösung inkubiert. Nach kurzem Abtropfen wurden die Membranen in Haushalts-Frischhaltefolie eingeschlagen und in einer Röntgenfilmkassette (MS-

Laborgeräte, Heidelberg) auf einen Röntgenfilm gelegt. Nach etwa 2 h Belichtung bei 37 °C oder üN bei 10 °C wurde der Röntgenfilm entwickelt (Hyperprozessor; Amersham-Pharmacia, Freiburg).

Um eine erneute Hybridisierung der Membranen zu ermöglichen, wurden gebundene Oligonukleotide durch Waschen mit Stripping-Lösung A (2 mal je 15 min, 37 °C) entfernt. Für das Entfernen gebundener 16S-rDNA-Fragmente wurde die Waschzeit auf jeweils 25 min erhöht. Bei der Colony-Slot-Blot-Hybridisierung wurde neben Stripping-Lösung A auch Stripping Lösung B eingesetzt (2 mal je 35 min, 68 °C).

2.13 In-situ-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden

2.13.1 Fixierung von Zellmaterial

Für die Fixierung von Zellmaterial aus Reinkulturen kamen je nach Zelltyp zwei verschiedene Methoden zur Anwendung. Gram-negative Bakterien wurden als Flüssigkultur angezogen, das Zellmaterial eines Aliquots (1 ml) bei 2000 x g für 5 min abzentrifugiert, das überstehende Medium abgenommen und das Pellet in 1 ml PBS suspendiert. Durch Zugabe von 100 µl einer 37%igen Formalinlösung (Merck, Darmstadt) und kurzem Durchmischen erfolgte die Zellfixierung. Bei Gram-positiven Bakterien und Archaea wurde das resultierende Zellpellet lediglich in 500 µl PBS suspendiert und die Fixierung erfolgte durch Zugabe von 500 µl absolutem Ethanol. Die Lagerung fixierter Reinkulturen erfolgte bei -20 °C. Aus dem Bioreaktor entnommene Polyurethanschaumkörper wurden zur Fixierung des aufgewachsenen Zellmaterials in Fixierlösung überführt und anschließend bei -70 °C gelagert :

Fixierlösung: 25 ml PBS + 2.5 ml Formalinlösung (37%) + 30 ml Ethanol (absolut)

Die auf den Polyurethanschaumkörpern haftenden, fixierten Zellen wurden entweder durch direktes Absaugen mit einer Pipette oder durch vorheriges Vortex-Mischen abgetrennt.

2.13.2 Hybridisierung

Die in situ Hybridisierung wurde, abgesehen von geringen Abweichungen, nach der von Amann et al. (1990a) beschriebenen Methode durchgeführt.

Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers:

0.9 M NaCl
0.02 M Tris-HCl, pH 7.2
0.01 % SDS

Die Stringenz der Hybridisierung wurde durch Zugabe von Formamid (0-23%) variiert.

Je nach Zelldichte wurde 10-20 µl fixiertes Zellmaterial auf ein Feld eines 6-Feld Objektträgers (Marienfeld KG) aufgebracht, gleichmäßig verteilt und durch Lufttrocknung bei 37 °C immobilisiert. Anschließend wurden die Zellen in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 80 %, 96 % je 3 min) entwässert und danach erneut luftgetrocknet. Auf jedes Feld des auf 46 °C erwärmten Objektträgers wurden 10 µl ebenfalls auf 46 °C vorgewärmte Hybridisierungslösung (9 µl Hybridisierungspuffer und 1 µl fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid [50 ng/µl]) gegeben und die Objektträger bei 46 °C für mindestens 2 h in einer feuchten Kammer inkubiert.

Anschließend wurde die Hybridisierungslösung mit a. dest. abgespült und die Objektträger bei 37 °C im Dunkeln luftgetrocknet. Neben der in situ Hybridisierung wurde eine Zelfärbung mit dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Sigma, Deisenhofen) durchgeführt. Dazu wurden je Feld 10 µl einer DAPI-Lösung (10 µg/ml) gegeben, 5 min im Dunkeln bei 37 °C inkubiert und der Objektträger danach mit a. dest. gespült und luftgetrocknet. Um ein rasches Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern, wurden die Objektträger mit Citifluor (Citifluor Ltd., London, Großbritannien) eingedeckt und unter dem Epifluoreszenz-Mikroskop betrachtet.

2.13.3 Nachweis fluoreszenzmarkierter Zellen

Der Nachweis fluoreszenzmarkierter Zellen erfolgte mittels Epifluoreszenzmikroskopie mit einem Axioscop Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena) und der HQ Filterkombination F41-001 (Anregung 480/40 nm, Emission 535/50 nm) und F41-007 (Anregung 535/50 nm, Emission 610/75 nm) von AHF Analysentechnik (Tübingen).

Bei 1000-facher Vergrößerung wurde jeweils das Phasenkontrastbild mit dem dazu gehörigen Epifluoreszenzbild verglichen. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte fotografisch mit Hilfe einer automatischen Kamera (Zeiss, Jena) und Kodak Ektachrome HC400-Film.

III ERGEBNISSE

1 Charakterisierung des TCB-dechlorierenden Konsortiums durch Analyse von 16S-rDNA-Genbibliotheken

Nach etwa sechsmonatiger Kultivierung der Mischkultur im Wirbelschichtreaktor wurde im Januar 1995 ein Aliquot dieser Population entnommen und die Gesamt-DNA extrahiert. Die bisher bekannten anaeroben, TCB-dechlorierenden Mischkulturen setzen sich aus Bakterien und methanogenen Archaea, die zu den *Euryarchaeota* zählen, zusammen (Holliger et al., 1992; Ramanand et al., 1993; Nowak et al., 1996; Middeldorp et al., 1997; Adrian et al., 1998). Um diese Populationen zu erfassen, wurden durch geeignete Primerpaare 16S-rRNA Genfragmente sowohl von Bakterien (etwa 1550 bp Länge) als auch von Euryarchaeota (etwa 1000 bzw. 1400 bp Länge) mittels PCR amplifiziert und in *E. coli* kloniert. Auf die Verwendung eines universellen Primerpaares, das die simultane Amplifizierung etwa 1000 bp langer 16S-rRNA Genfragmente von Bakterien und Archaea ermöglicht, wurde verzichtet, weil solch kurze Gensequenzen zu Artefakten in der nachfolgenden phylogenetischen Analyse führen können (Stackebrandt und Rainey, 1995). Die Zusammensetzung der 16S-rDNA-Genbibliothek einer mikrobiellen Mischkultur kann durch experimentelle Parameter, wie die Wahl der Primer, die PCR-Zyklen oder die Klonierungsmethode beeinflusst werden (zur Übersicht s. von Wintzingerode et al., 1997). Daher wurden je zwei verschiedene PCR- bzw. Klonierungsmethoden angewandt und die resultierenden rDNA-Genbibliotheken miteinander verglichen (rDNA-Genbibliotheken A,B und C,D). Im Dezember 1996, fast zwei Jahre nach der ersten Probennahme, wurden insgesamt vier Proben entnommen. Ausgehend von extrahierter Gesamt-DNA wurden vier bakterielle 16S-rDNA-Genbibliotheken angelegt (16S-rDNA-Genbibliotheken E-H) und diese mit den bakteriellen rDNA-Genbibliotheken A und B verglichen.

1.1 DNA-Extraktion und Anlage der 16S-rDNA-Genbibliotheken

Mit Ausnahme der Probe vom 23.12.96 zeigten alle DNA-Extrakte im Agarose-Gel neben der dominierenden, hochmolekularen DNA-Bande eine Vielzahl an niedermolekularen Degradationsprodukten. Die bräunliche Färbung dieser DNA-Extrakte, sowie die Inhibition der PCR-Amplifizierung bakterieller 16S-rDNA, lassen vermuten, daß die extrahierte DNA mit starken PCR-Inhibitoren, wie etwa

Huminsäuren, verunreinigt war. Da es sich bei diesen Stoffen um Verbindungen handelt, die im Agarose-Gel eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit aufweisen als hochmolekulare DNA (Liesack und Stackebrandt, 1992), konnte DNA mit einer Größe über 9 kb aus einem präparativen Agarose-Gel isoliert und erfolgreich für eine PCR-Amplifizierung prokaryotischer 16S-rDNA eingesetzt werden (Abb. III.1.1.1).

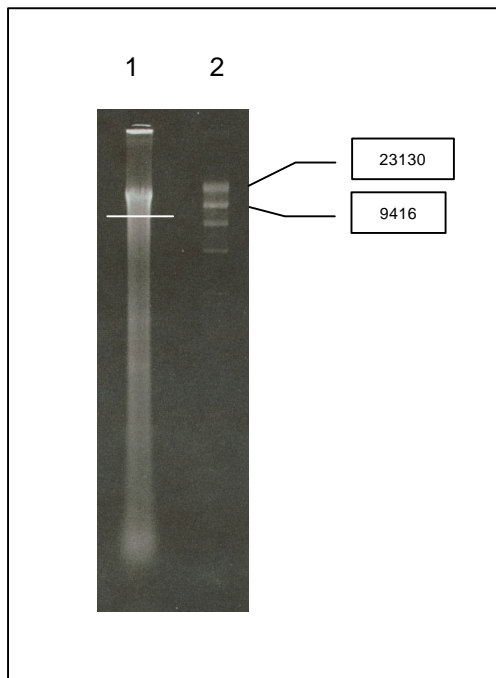


Abb. III.1.1.1 Analyse des Gesamt DNA-Extraktes mittels Agarosegelelektrophorese. [1] Gesamt-DNA der Probennahme vom 31.1.95 (5 μ l). Die DNA oberhalb des weißen Strichs wurde eluiert und für die PCR-Amplifizierung verwendet. [2] DNA-Marker II (1 μ l). Die Größe der Fragmente ist in bp angegeben.

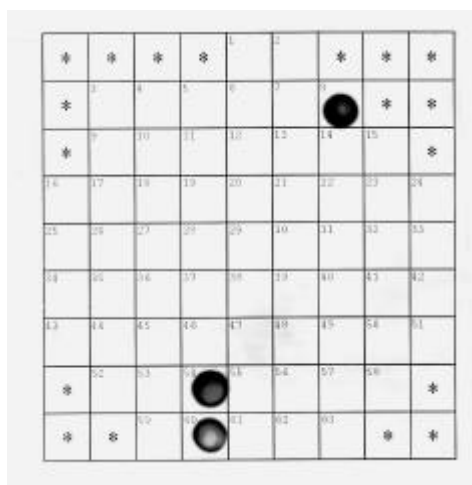
In allen PCR-Ansätzen (s. II 2.7.3) wurden ausschließlich DNA-Fragmente der erwarteten Länge amplifiziert. Die Ansätze A, B und E-H (s. Tab. II.2.7.3.1) ergaben Amplifikate mit einer Länge von je etwa 1550 bp, während im PCR-Ansatz C DNA-Fragmente von etwa 1400 bp und im Ansatz D von etwa 1000 bp Länge amplifiziert wurden. Die Produktausbeuten lagen bei allen PCR-Ansätzen in etwa bei 6 ng/ μ l, lediglich PCR-Ansatz G (s. II 2.7.3) mußte durch Ethanolfällung um den Faktor 10 konzentriert werden, um eine nachfolgende Klonierung zu ermöglichen. Bei allen mitgeführten Negativkontrollen (ohne Template-DNA bzw. mit Negativkontrolle der präparativen Gelelektrophorese) waren im Agarose-Gel keine Amplifikationsprodukte sichtbar. Die Klonierung der PCR-Amplifikate erfolgte mittels TA- oder LIC-Klonierung. Im Gegensatz zur Klonierung von PCR-Produkten nach Einfügung von Restriktionsschnittstellen und Spaltung mit Restriktionsendonukleasen (Scharf et al., 1986) wird bei diesen Methoden ein Verlust von 16S-rDNA-Amplifikaten aufgrund von internen Restriktionsschnittstellen vermieden. Eine unter diesem Aspekt

ebenfalls mögliche Blunt-End Klonierung der PCR-Produkte wurde aufgrund der im Vergleich zur TA- oder LIC-Klonierung geringeren Effizienz nicht angewendet. Bei den Transformationsansätzen der TA-Klonierung lag die Ausbeute bei $5.6 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ Zellen/ μg DNA. Bei der LIC-Klonierung lag die Ausbeute um den Faktor 2 höher.

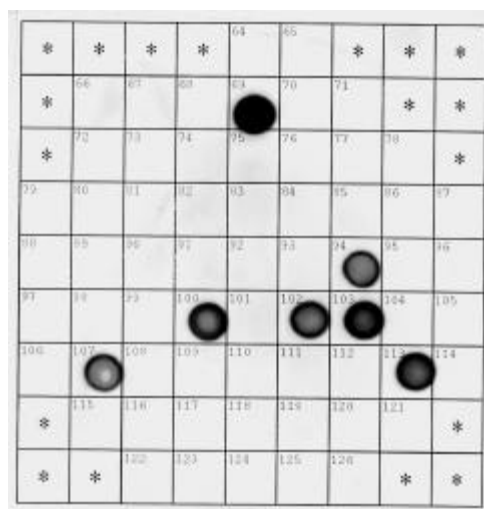
1.2 Analyse der 16S-rDNA-Genbibliotheken A und B durch Hybridisierung mit DIG-markierten rDNA-Fragmenten

Insgesamt wurden 185 zufällig ausgewählte rekombinante Klone der Genbibliothek A (SJA-Klone) und 176 Klone der Genbibliothek B (SJB-Klone) mittels Dot-Blot-Hybridisierung untersucht. Um die Analyse auf rekombinante Klone zu beschränken, die ein bakterielles 16S-rDNA-Insert enthielten, erfolgte die Hybridisierung mit der Bakterien-spezifischen, 16S-rDNA gerichteten Oligonukleotidsonde 1114F. Unter stringenten Hybridisierungsbedingungen (52 °C) zeigten 146 (79%) SJA-Klone und 163 (93%) SJB-Klone ein Signal. Da Oligonukleotid 1114F strangbindend ist (Strangprimer), wurden die Hybridisierungsergebnisse nicht durch Bindung an kontaminierende *E. coli* 16S-rRNA verfälscht. Die Sequenzierung zufällig ausgewählter 1114F-negativer Klone ergab, daß vier weitere SJA-Klone (SJA-4, -6, -57 und SJA-178) vollständige bakterielle 16S-rDNA-Inserts enthielten. Die rDNA-Inserts dieser Klone wiesen drei Basen Unterschied zur Zielsequenz der Oligonukleotidsonde 1114F auf. Demgegenüber waren fünf 1114F-positive SJA-Klone entweder kontaminiert, enthielten nur ein partielles 16S-rDNA-Insert oder DNA unbekannter Herkunft. Um den für einen Vergleich der beiden bakteriellen Genbibliotheken A und B nötigen Sequenzieraufwand zu reduzieren, war es nötig ein Screening-Verfahren zu entwickeln, das den schnellen Nachweis sehr ähnlicher oder identischer Klonsequenzen ermöglichte. Dies gelang durch die Hybridisierung mit PCR-amplifizierten, DIG-markierten 16S-rDNA-Klonfragmenten. Zunächst wurden DIG-markierte rDNA-Fragmente einiger zufällig ausgewählter SJA-Klone für die Hybridisierung der übrigen SJA-Klone und der SJB-Klone eingesetzt. Anschließend wurden SJA-Klone, die nicht mit einem der erwähnten 16S-rDNA-Fragmente hybridisierten, ausgewählt, um neue DIG-markierte Fragmente zu erstellen. Dieser Vorgang wurde mit insgesamt 29 verschiedenen 16S-rDNA-Fragmenten durchgeführt. Die auf Partiaalsequenzen (330 bis 1500 bp) beruhende Sequenzanalyse 55 Hybridisierungs-positiver SJA-Klone und fünf positiver SJB-Klone zeigte, daß von 29 getesteten 16S-rDNA-Fragmenten 28 mit identischen oder

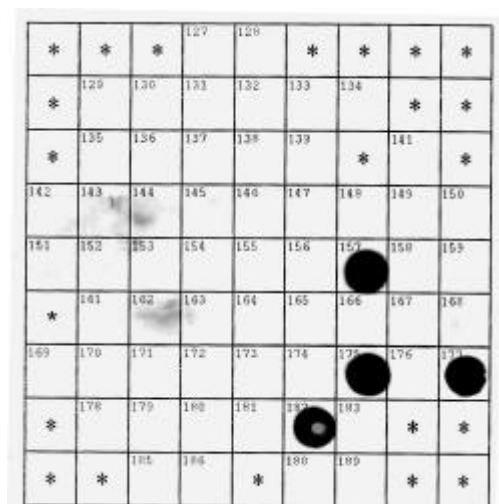
sehr ähnlichen Klonen hybridisierten (Sequenzhomologien über 95.9%). Lediglich Klon SJA-65 hybridisierte mit Klonen, deren 16S-rDNA-Inserts geringere Sequenzhomologien aufwiesen. Alle verbleibenden SJA-Klone, die kein Hybridisierungssignal zeigten, wurden sequenziert. Dieses kombinierte Vorgehen erlaubte die Identifizierung von 52 Klonfamilien mit Sequenzhomologien über 95.9% in Genbibliothek A, die jeweils nach dem repräsentativen, vollständig sequenzierten SJA-Klon benannt wurden. Die Ergebnisse der Sequenzierungen und Hybridisierungen mit den 16S-rDNA-Fragmenten sind in Tab. III.2.2.1 zusammengefaßt. Ein Vergleich der Genbibliotheken A und B ergab, daß die Klonfamilien SJA-36, -102 und SJA-186 mehr als ein Viertel aller SJA- und SJB-Klone repräsentierten (28.8% der SJA-Klone und 26.4% der SJB-Klone). Sechzehn Klonfamilien waren in beiden Genbibliotheken mit ähnlich geringen Häufigkeiten zwischen 0.6 und 4.9% vertreten, was zwischen einem und acht positiven Klonen entsprach. Im Gegensatz dazu zeigte Klonfamilie SJA-102 in Genbibliothek A eine hohe Häufigkeit (9.6%) und in Genbibliothek B lediglich eine Häufigkeit von 4.9% und die Klonfamilien SJA-121, -131, und SJA-181 waren bis zu siebenmal häufiger in einer der beiden Genbibliotheken. Neben Klonfamilie SJA-131, die fünf SJA-Klone repräsentierte, konnten fünf einzeln vorkommende SJA-Klonsequenzen nicht in Genbibliothek B nachgewiesen werden. In Abb. III.2.2.1 ist die repräsentative Hybridisierung mit dem PCR-amplifizierten, DIG-markierten 16S-rDNA-Fragment des Klons SJA-103 gezeigt.



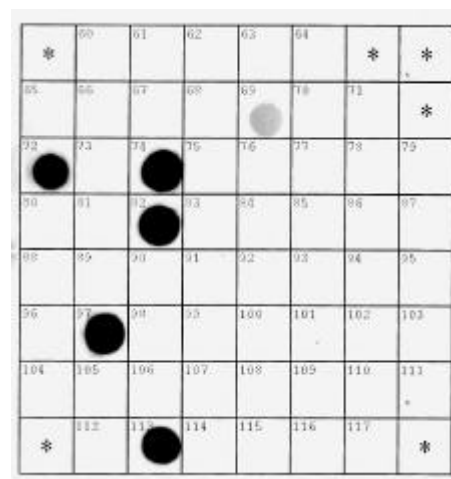
A



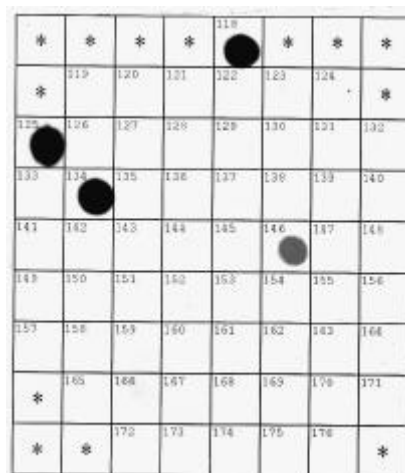
B



C



D



E

Abb. III.1.2.1

Abb. III.1.2.1 Dot-Blot-Hybridisierung der aufgereinigten Plasmid-DNA von SJA-Klonen (A-C) und SJB-Klonen (D und E) mit dem PCR-amplifizierten, DIG-markierten rDNA-Fragment des Klonen SJA-103. Die rDNA-Inserts der Klone SJA-8, -69, -100, -102 und SJA-182 wurden sequenziert (Tab. III.2.2.1). Die Sequenzhomologien zwischen 96.4 und 98.1% zeigten die Zugehörigkeit zu einer Klonfamilie, die nach dem vollständig sequenzierten Klon SJA-102 benannt wurde. Die schwachen Hybridisierungssignale der Klone SJB-69 und SJB-146 wurden als negativ gewertet.

Tab. III.1.2.1 Durch Hybridisierung mit DIG-markierten rDNA-Fragmenten und Sequenzierung ermittelte SJA-Klonfamilien.

Representativer Klon einer Klonfamilie (vollständige Sequenz)	Häufigkeit in Genbibliothek A ^a		Zusätzlich sequenzierte Klone einer Klonfamilie ^b		Häufigkeit in Genbibliothek B ^c	
Holophaga/Acidobacterium Phylum						
SJA-36	14	(9.6)	SJA-32 (99.8) SJA-92 (99.1) SJA-96* (99.7) SJA-104 (97.6) SJA-132 * (99.4) SJA-158 (99.5) SJA-179 (99.2)		16	(9.8)
SJA-87	4	(2.7)	SJA-98 (100) SJA-135* (99.5)		2	(1.2)
SJA-149	1	(0.7)	-		ND ^e	
Grüne schwefelfreie Bakterien						
SJA-15	3	(2.1)	SJA-2 (99.4) SJA-126 (99.4)		2	(1.2)
SJA-35	1	(0.7)	-		- ^d	
SJA-58	1	(0.7)	-		1	(0.6)
SJA-61	1	(0.7)	-		-	
SJA-68	1	(0.7)	- -		-	
SJA-101	2	(1.4)	SJA-59* (98.4)		ND	
SJA-108	1	(0.7)	-		ND	
SJA-116	2	(1.4)	SJA-127* (99.7)		ND	
SJA-117	1	(0.7)	-		ND	
SJA-131	5	(3.4)	SJA-66 (99.7)		-	
SJA-170	1	(0.7)	-		-	
Gram-positive Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt						
SJA-19	6	(4.1)	SJA-40* (98.8) SJA-44* (99.7) SJA-47* (98.5) SJA-50* (100)		5	(3.1)

			SJA-139* (99.7)		
			SJB-50 (97.8)		
			SJB-87* (99.7)		
			SJB-100* (98.6)		
			SJB-131* (99.8)		
			SJB-168* (98.5)		
SJA-29	2	(1.4)	SJA-39 (98.3)	ND	
SJA-65	5	(3.4)	SJA-20* (91.4)	6	(3.7)
			SJA-76* (93.1)		
SJA-84	1	(0.7)	-	ND	
SJA-112	5	(3.4)	SJA-133* (99.6)	6	(3.4)
SJA-118	2	(1.4)	SJA-173* (96.3)	1	(0.6)
SJA-136	1	(0.7)	-	ND	
SJA-143	1	(0.7)	-	ND	
Spirochäten					
SJA-102	14	(9.6)	SJA-8 (96.4)	8	(4.9)
			SJA-69* (96.7)		
			SJA-100 (98.1)		
			SJA-182* (96.4)		
SJA-168	1	(0.7)	-	ND	
a-Untergruppe der Proteobacteria					
SJA-9	1	(0.7)	-	-	
SJA-53	7	(4.8)	SJA-1* (98.7)	5	(3.1)
			SJA-46* (99.5)		
			SJA-49* (99.5)		
			SJA-70* (98.8)		
			SJA-90* (99.5)		
			SJA-110* (99.5)		
SJA-105	1	(0.7)	-	ND	
b-Untergruppe der Proteobacteria					
SJA-10	1	(0.7)	-	ND	
SJA-21	2	(1.4)	SJA-37 (99.7)	ND	
SJA-23	1	(0.7)	-	ND	
SJA-52	2	(1.4)	SJA-71* (99.0)	ND	
SJA-62	3	(2.1)	SJA-81* (99.2)	ND	
SJA-109	2	(1.4)	SJA-144* (99.7)	ND	
SJA-155	1	(0.7)	-	ND	
SJA-186	14	(9.6)	SJA-33 (99.8)	19	(11.7)
			SJA-79* (99.5)		
			SJA-80* (99.7)		
			SJA-91* (99.7)		

			SJA-93* (99.5)		
			SJA-128 (99.6)		
			SJA-134* (100)		
			SJA-161 (99.4)		
			SJA-167 (99.6)		
g-Untergruppe der Proteobacteria					
SJA-64	4	(2.7)	SJA-38* (99.5)	2	(1.2)
			SJA-67* (96.0)		
			SJA-129* (96.3)		
d-Untergruppe der Proteobacteria					
SJA-5	1	(0.7)	- -	ND	
SJA-51	1	(0.7)	- -	ND	
SJA-63	4	(2.7)	SJA-188 (97.8)	4	(2.5)
SJA-111	3	(2.1)	SJA-146* (99.1)	ND	
			SJA-152* (96.4)		
SJA-162	1	(0.7)	- -	ND	
SJA-172	1	(0.7)	- -	1	(0.6)
Gram-positive Bakterien mit hohem G+C-Gehalt					
SJA-181	1	(0.7)	- -	7	(4.3)
Grüne Schwefelbakterien					
SJA-28	1	(0.7)	- -	2	(1.2)
Unbekannte Zuordnung					
SJA-88	3	(2.1)	SJA-12* (99.6)	2	(1.2)
Phylum Cluster WS1					
SJA-43	1	(0.7)	- -	-	
Phylum Cluster TM6					
SJA-4	4	(2.7)	SJA-57 (99.6)	2	(1.2)
Phylum Cluster OP10					
SJA-22	1	(0.7)	-	-	
SJA-121	5	(3.4)	SJA-115 (99.9)	1	(0.6)
SJA-171	1	(0.7)	- -	1	(0.6)
SJA-176	1	(0.7)	- -	1	(0.6)

^a Prozentsatz 1114F-positiver SJA-Klone in Klammern.

^b Sequenzhomologien über 95.9% zum repräsentativen Klon definieren eine Klonfamilie.

^c Prozentsatz 1114F-positiver SJB-Klone in Klammern.

^d Keine positiven Signale.

^e ND, nicht bestimmt, da keine Hybridisierung mit rDNA-Fragmenten.

* Nahezu vollständig (>80%) sequenziertes rDNA-Insert.

1.3 Bestimmung artifizieller, chimärer 16S-rDNA-Sequenzen

Bei der gleichzeitigen PCR-Amplifizierung homologer DNA können Mischsequenzen auftreten, die aus mindestens zwei verschiedenen DNA-Fragmenten bestehen. Diese Artefakte werden als PCR-Chimären bezeichnet und ihr Auftreten täuscht bei der Analyse komplexer mikrobieller Habitats mittels direkt amplifizierter 16S-rDNA eine überhöhte, künstliche Diversität vor (zur Übersicht s. von Wintzingerode et al., 1997). Die Überprüfung aller repräsentativen SJA-Sequenzen auf eine mögliche chimäre Struktur ergab, daß sich Klon SJA-7 aus der 16S-rDNA eines unbekannten Vertreters der Spirochäten (*E. coli* Position 7 - 500) und der eines Vertreters der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt (*E. coli* Position 501-1541) zusammensetzte. Somit reduzierte sich die Anzahl der repräsentativen SJA-Klone bzw. Klonfamilien in Genbibliothek A auf 51.

1.4 Phylogenetische Klassifizierung der SJA-Klonsequenzen durch vergleichende 16S-rDNA-Sequenzanalyse

Aus Abb. III.1.4.2 und III.1.4.3 wird ersichtlich, daß die phylogenetische Analyse den größten Teil der 51 repräsentativen SJA-Sequenzen bereits bekannten bakteriellen Phyla zuordnet. Etwa 25% der SJA-Sequenzen werden jedoch phylogenetischen Gruppen zugeordnet, die sich überwiegend oder ausschließlich aus unkultivierten Bakterien zusammensetzen (*Holophaga/Acidobacterium* Phylum [Ludwig et al., 1997]; Phylum Cluster OP10 [Hugenholtz et al., 1998]; Phylum Cluster TM6 [Rheims et al., 1996], Phylum Cluster WS1 [Dojka et al., 1998]). Daneben zeigt Klonsequenz SJA-88 keine nähere Verwandtschaft zu einer der bisher beschriebenen phylogenetischen Gruppen (Tab. III.1.4.1). Die phylogenetische Sonderstellung dieser rDNA-Sequenz wird durch eine ungewöhnliche Sekundär- und Tertiärstruktur der abgeleiteten 16S-rRNA-Sequenz bestätigt, da die für die Ausbildung eines Pseudoknotens mitverantwortlichen hochkonservierten Nukleotide G570 und C866 (*E. coli*-Position) gegen A570 und U866 ausgetauscht sind (Abb. III.1.4.1).

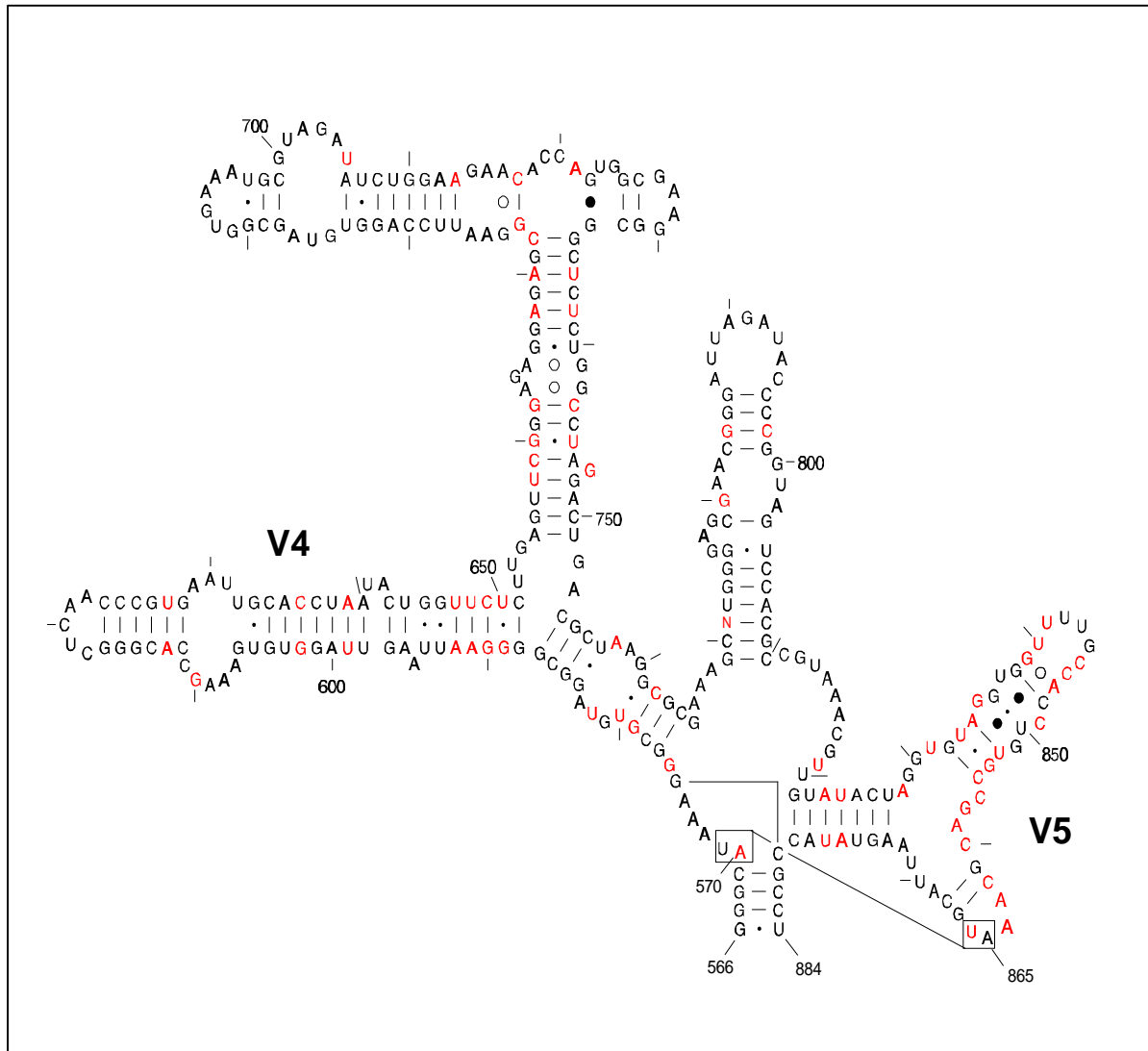


Abb. III.1.4.1 Sekundärstruktur der aus rDNA-Klon SJA-88 abgeleiteten 16S-rRNA-Sequenz. Dargestellt sind die *E. coli*-Positionen 566 bis 884 mit den variablen Regionen V4 und V5. Kanonische Basenpaare (Watson-Crick Paarung) sind mit Linien verbunden, G:U-Basenpaare sind mit Punkten, A:G-Basenpaare sind mit offenen Kreisen und andere nichtkanonische Paarungen mit ausgefüllten Kreisen verbunden. Tertiäre Interaktionen zwischen einzelnen Nukleotiden (*E. coli* Position 575:880) und Nukleotidpaaren (*E. coli* Positionen 570-571:865-866) sind mit dickeren, langen Linien verbunden. Jede zehnte Position ist mit einem Strich markiert und jede 50ste nummeriert. Gegenüber der *E. coli* 16S-rRNA abweichende Nukleotide sind farbig markiert (modifiziert nach Gutell et al., 1994).

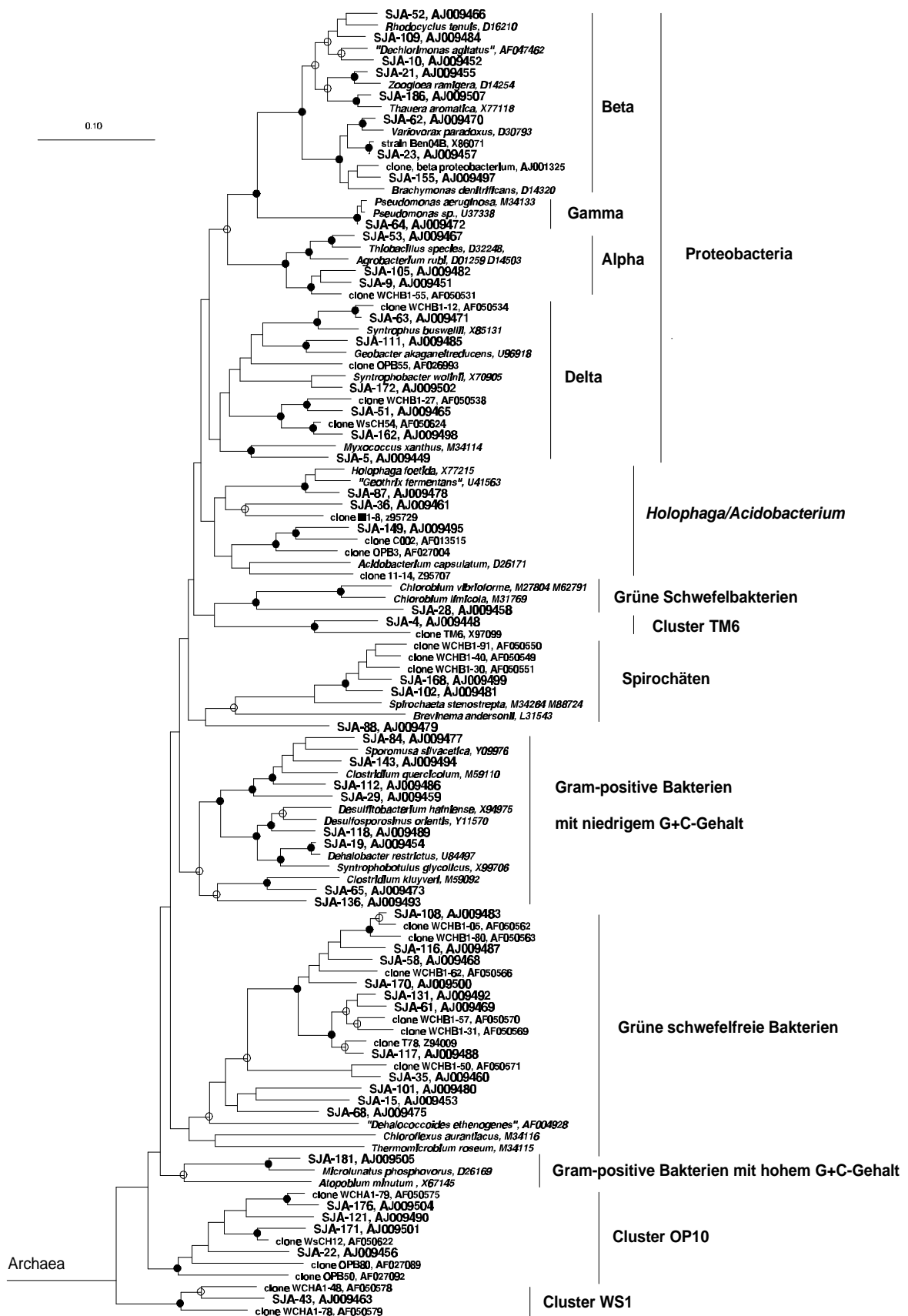


Abb. III.1.4.2 Phylogenetische Beziehung repräsentativer SJA-Klone zu bakteriellen 16S-rRNA-Sequenzen. Die Analyse basierte auf dem Vergleich von 1228 Positionen. Aus dem zugrundeliegenden Sequenzalignment wurden mittels einer mit dem ARB-Programmpaket definierten Konsensusmaske hypervariable Bereiche bzw. unsichere Positionen ausgeschlossen. Die 16S-rRNA-Sequenzen von *Methanosaeta concilii* (X16932) und *Thermoplasma acidophilum* (M20822) wurden als Bezugsgruppe gewählt. Klonsequenzen, die in einer unabhängigen Studie (Dojka et al., 1998) aus einem kontaminierten Grundwasser isoliert wurden, tragen die Benennungen WCHB1, WCHA1 oder WsCH. Die Zuverlässigkeit des Verzweigungsmusters wurde durch eine Bootstrap-Analyse mit 1000-facher Replikation überprüft. Signifikante Verzweigungspunkte (Bootstrapwerte >74%) sind mit einem schwarzen Punkt markiert. Verzweigungspunkte mit Bootstrapwerten zwischen 50 und 74% sind mit einem Kreis markiert. Nicht aufgelöste Verzweigungspunkte sind nicht markiert. Der Maßstab verdeutlicht 10% Sequenzunterschied.

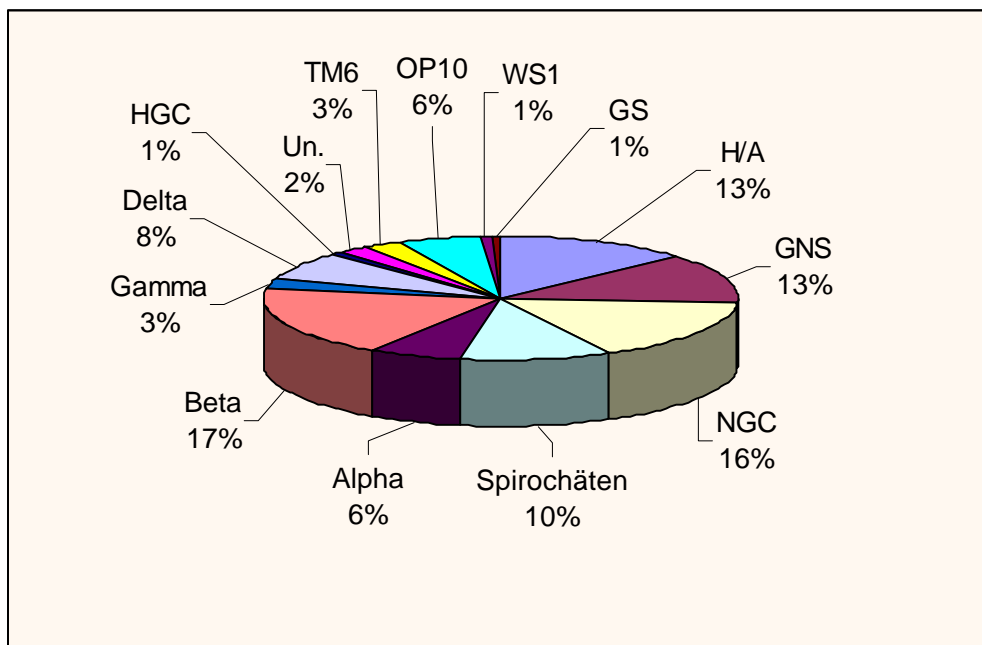


Abb. III.1.4.3 Phylogenetische Klassifizierung von 144 untersuchten SJA-Klonsequenzen. [H/A] *Holophaga/Acidobacterium* Phylum. [GNS] Grüne schwefelfreie Bakterien. [NGC] Gram-positive Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt. [Alpha] α -Proteobakterien. [Beta] β -Proteobakterien. [Gamma] γ -Proteobakterien. [Delta] δ -Proteobakterien. [HGC] Gram-positive Bakterien mit hohem G+C-Gehalt. [GS] Grüne Schwefelbakterien. [Un.] Unbekannte Zuordnung. [TM6] Phylum Cluster TM6 (Rheims et al., 1996). [OP10] Phylum Cluster OP10 (Hugenholtz et al., 1998). [WS1] Phylum Cluster WS1 (Dojka et al., 1998).

Tab. III.1.4.1 Sequenzhomologien zwischen SJA-Sequenzen und ihren nächsten phylogenetischen Verwandten.

Klon	Nächster phylogenetischer Verwandte	Accession Nr.	% Homologie
SJA-4	rDNA Klon TM6	X97099	87.6
SJA-5	<i>Myxococcus xanthus</i>	M34114	87.5
SJA-9	rDNA Klon WCHB1-55	AF050531	94.7
SJA-10	" <i>Dechlorimonas agitated</i> "	AF047462	95.0
SJA-15	rDNA Klon T78	Z94009	81.2
SJA-19	<i>Dehalobacter restrictus</i>	U84497	98.8
SJA-21	<i>Zoogloea ramigera</i> ATCC 19544	D14254	96.7
SJA-22	rDNA Klon WsCH12	AF050622	87.1
SJA-23	Stamm Ben04B	X86071	99.7
SJA-28	<i>Chlorobium limicola</i>	M31769	80.4
SJA-29	<i>Clostridium quercicolum</i>	M59110	86.1
SJA-35	rDNA Klon WCHB1-50	AF050571	94.8
SJA-36	rDNA Klon iii1-8	Z95729	86.5
SJA-43	rDNA Klon WCHA1-48	AF050578	90.3
SJA-51	rDNA Klon WCHB1-27	AF050538	93.6
SJA-52	<i>Rhodocyclus tenuis</i>	D16210	94.4
SJA-53	<i>Thiobacillus</i> sp. strain THI051	D32248	95.9
SJA-58	rDNA Klon WCHB1-05	AF050562	91.0
SJA-61	rDNA Klon WCHB1-57	AF050570	93.7
SJA-62	<i>Variovorax paradoxus</i>	D30793	97.0
SJA-63	rDNA Klon WCHB1-12	AF050534	98.1
SJA-64	<i>Pseudomonas</i> sp. CRE11	U37338	99.6
SJA-65	<i>Clostridium scatologenes</i>	M59104	93.7
SJA-68	rDNA Klon T78	Z94009	83.3
SJA-84	<i>Clostridium quercicolum</i>	M59110	91.0
SJA-87	<i>Holophaga foetida</i>	X77215	94.1
SJA-88	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	X17547	83.8
SJA-101	rDNA Klon T78	Z94009	80.4
SJA-102	rDNA Klon WCHB1-91	AF050550	93.4
SJA-105	rDNA Klon WCHB1-55	AF050531	94.2
SJA-108	rDNA Klon WCHB1-05	AF050562	98.0
SJA-109	<i>Rhodocyclus tenuis</i>	D16210	94.6
SJA-111	<i>Geobacter metallireducens</i>	L07834	93.5
SJA-112	<i>Clostridium quercicolum</i>	M59110	90.6
SJA-116	rDNA Klon WCHB1-80	AF050563	91.9
SJA-117	rDNA Klon T78	Z94009	96.8
SJA-118	<i>Desulfosporosinus orientis</i>	Y11570	93.1
SJA-121	rDNA Klon WCHA1-79	AF050575	89.5
SJA-131	rDNA Klon WCHB1-57	AF050570	95.2
SJA-136	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	M59113	85.7
SJA-143	<i>Clostridium quercicolum</i>	M59110	90.5
SJA-149	rDNA Klon C002	AF013515	90.8
SJA-155	rDNA Klon Beta Proteobacterium	AJ001325	95.9
SJA-162	rDNA Klon WsCH54	AF050624	98.0
SJA-168	rDNA Klon WCHB1-40	AF050549	94.6
SJA-170	rDNA Klon WCHB1-05	AF050562	89.9
SJA-171	rDNA Klon WsCH12	AF050622	95.1
SJA-172	<i>Syntrophobacter wolinii</i>	X70905	94.8
SJA-176	rDNA Klon WCHA1-79	AF050575	96.1
SJA-181	<i>Microlunatus phosphovor</i>	D26169	93.8
SJA-186	<i>Thauera aromatica</i>	X77118	96.9

Vertreter bekannter Bakteriengattungen

Keine der ermittelten SJA-Sequenzen war mit einer der in öffentlichen Datenbanken hinterlegten 16S-rRNA-Sequenzen identisch (Tab. III.1.4.1). Jedoch zeigten die vollständig bestimmten SJA-Sequenzen der Klonfamilien SJA-19, -21, -62, -64 und -186 Homologien zwischen 96.7 und 99.6% zu Vertretern der Gattungen *Dehalobacter*, *Zoogloea*, *Variovorax*, *Pseudomonas* und *Thauera*. Weiterhin zeigte Klonsequenz SJA-23 Homologien zwischen 98.3 und 99.7% zu den Isolaten B3 (Kalmbach et al., 1997), Ben04B und Ben05B (Bradford et al., 1996). Die geringen rDNA-Sequenzunterschiede innerhalb der sequenzierten Vertreter der genannten Klonfamilien (bis auf wenige Ausnahmen weniger als 2%, Tab. III.1.2.1, III.1.4.1 und 2) lassen vermuten, daß sich für alle rDNA-Sequenzen dieser Klonfamilien ähnlich hohe Homologien ergaben. Legt man zugrunde, daß Vertreter einer Bakteriengattung i.d.R. 16S-rRNA Sequenzhomologien zwischen 97 und 100% aufweisen (Stackebrandt und Goebel, 1994) ist somit anzunehmen, daß etwa 21% der untersuchten SJA-Klone noch nicht-kultivierte oder aber noch nicht-sequenzierte Vertreter bekannter Bakteriengattungen repräsentieren.

Tab. III.1.4.2 16S-rDNA-Sequenzhomologien zwischen SJA- und SJB-Klonen der Klonfamilie SJA-19 und Vertretern der Gattung *Dehalobacter*.

	<u>16S-rDNA-Sequenzhomologie (%)</u>											
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
1. DebRes												
2. DebRe	99.5											
3. SJA-19*	98.8	98.6										
4. SJA-40	99.4	99.8	98.6									
5. SJA-44*	98.7	98.5	99.7	98.4								
6. SJA-47	99.2	99.7	98.5	99.7	98.3							
7. SJA-50*	98.7	98.5	99.9	98.6	99.7	98.4						
8. SJA-139*	98.6	98.4	99.7	98.3	99.5	98.2	99.7					
9. SJB-50 [#]	98.9	99.3	97.8	99.3	97.9	99.3	97.8	97.6				
10. SJB-87*	98.6	98.4	99.8	98.3	99.6	98.2	99.7	99.6	97.7			
11. SJB-100	99.4	99.9	98.5	99.8	98.4	99.6	98.5	98.2	99.4	98.4		
12. SJB-131*	98.7	98.4	99.8	98.4	99.5	98.3	99.8	99.6	97.7	99.6	98.3	
13. SJB-168	99.4	99.9	98.4	99.7	98.4	99.5	98.3	98.2	99.4	98.3	99.8	98.3

DebRes *Dehalobacter restrictus* Stamm PER-K23, DSM 9455^T

DebRe *Dehalobacter restrictus* Stamm TEA

* Sequenzen enthalten eine 84 bp Insertion zwischen *E. coli* Position 75 und 86 (s. VI.1)

[#] Partiaalsequenz, *E. coli* Position 27-409 und 1034-1524.

Gruppierung mit Wurtsmith rDNA-Klonsequenzen

Zahlreiche SJA-Sequenzen stehen in enger phylogenetischer Verwandtschaft zu rDNA-Klonsequenzen, die aus einem anaeroben, Chlororganika-kontaminierten Grundwasser isoliert wurden (Wurtsmith-Habitat; Dojka et al., 1998). Wie aus Tab. III.1.4.1 ersichtlich, waren für insgesamt neunzehn repräsentative SJA-Sequenzen innerhalb der Proteobakterien, der Spirochäten, der Grünen schwefelfreien Bakterien und den Phylum Clustern OP10 und WS1 (Hugenholtz et al., 1998; Dojka et al., 1998) Wurtsmith rDNA-Sequenzen die nächsten phylogenetischen Verwandten mit Sequenzhomologien zwischen 87.1 und 98.1%. Davon zeigten 13 Klone Sequenzhomologien von mehr als 93.4%. Unter Berücksichtigung der geringen Sequenzunterschiede innerhalb der entsprechenden Klonfamilien gruppieren vermutlich etwa 30% der untersuchten SJA-Sequenzen (44 von 145) mit rDNA-Sequenzen des Wurtsmith Standortes.

1.5 Zusammensetzung der 16S-rDNA-Genbibliotheken C und D und phylogenetische Klassifizierung der Klonsequenzen durch vergleichende 16S-rDNA-Sequenzanalyse

Rekombinante Klone aus Genbibliothek C und D (SJC- und SJD-Klone) wurden zufällig ausgewählt und die Plasmid-Inserts PCR-amplifiziert. Etwa 75% der ausgewählten Klone enthielten ein Insert der erwarteten Länge. Ein erster Hinweis auf die Zusammensetzung der Genbibliotheken ergab sich durch die vergleichende Sequenzanalyse zufällig ausgewählter Klone. Die ermittelten rDNA-Sequenzen zeigten sehr hohe Homologien zur 16S-rDNA von *Methanosaeta concilii* (96.5-99.6). Um die Häufigkeit dieser Klonsequenzen in den Genbibliotheken C und D zu bestimmen, wurde eine Oligonukleotidsonde (MCONC) entwickelt, die spezifisch für *M. concilii* und die nah verwandten Klonsequenzen war. Von insgesamt 153 SJC-Klonen und 56 SJD-Klonen hybridisierten unter stringenten Bedingungen (54 °C) 136 SJC-Klone (88.8%) und 32 SJD-Klone (57.1%) mit der Oligonukleotidsonde MCONC (Abb. III.1.5.1). Die Spezifität der Hybridisierung mit MCONC wurde durch das Mitführen geeigneter Kontroll-DNA und bereits sequenzierter Klone in der Dot-Blot-Hybridisierung sichergestellt.

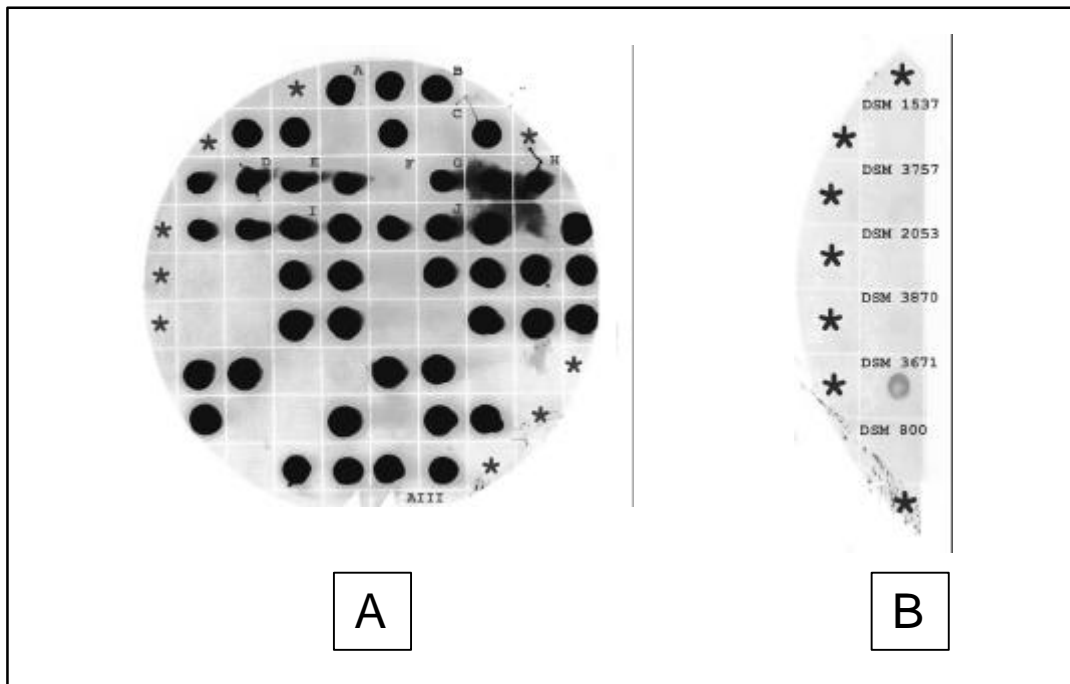


Abb. III.1.5.1 Dot-Blot Hybridisierung mit der Oligonukleotidsonde MCONC. [A] In den obersten vier Reihen sind die PCR-amplifizierten rDNA-Inserts von 26 SJC-Klonen und in den übrigen Reihen die von 38 SJD-Klonen aufgetragen. Die mit einem Stern gekennzeichneten Felder markieren Positionen ohne DNA. Die mit A bis J gekennzeichneten Klone wurden sequenziert. A: SJC-11b; B: SJC-23b; C: SJC-92b; D: SJC-101a; E: SJC-111a; F: SJC-108a; G: SJC-125a; H: SJC-129a; I: SJC-131a; J: SJC-117a. [B] Mitgeführte Kontroll-rDNA. *Methanococcus voltae* DSM 1537, *Haloferax volcanii* DSM 3757, *Methanosarcina mazei* DSM 2053, *Methanosaeta thermophila* DSM 3870, *Methanosaeta concilii* DSM 3671, *Methanosarcina barkeri* DSM 800.

Aufgrund der Dominanz *Methanosaeta concilii*-ähnlicher Klone in den Genbibliotheken C und D wurden nur wenige MCONC-negative Klone analysiert. Fünf von sechs zufällig ausgewählten MCONC-negativen SJC- und SJD-Klonen zeigten nach vergleichender 16S-rDNA-Sequenzanalyse die höchsten Homologien zu Vertretern der Gattungen *Methanosarcina* bzw. *Methanobacterium*, während ein Klon (SJC-92b) die höchste Homologie zu einer rDNA Klonsequenz des Wurtsmith Standortes aufwies (Dojka et al., 1998) (Abb. III.1.5.2 und Tab. III.1.5.1).

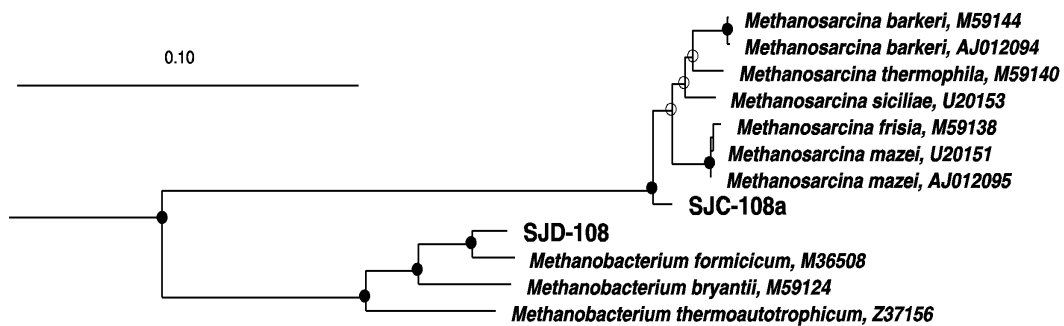


Abb. III.1.5.2 Phylogenetisches Dendrogram zweier SJC/D-Klone, die kein Hybridisierungssignal mit der Oligonukleotidsonde MCONC zeigten. Die 16S-rDNA-Sequenzen von *Methanosarcina barkeri* DSM 800^T und *M. mazei* DSM 2053^T wurden in dieser Arbeit bestimmt (Accession numbers AJ012094 und AJ012095). Die 16S-rRNA-Sequenz von *Methanococcus jannaschii* (M59126) diente als Bezugsgruppe. Die Zuverlässigkeit des Verzweigungsmusters wurde durch eine Bootstrap-Analyse mit 100-facher Replikation überprüft. Signifikante Verzweigungspunkte (Bootstrapwerte >74%) sind mit einem schwarzen Punkt markiert. Verzweigungspunkte mit Bootstrapwerten zwischen 50 und 74% sind mit einem Kreis markiert. Nicht aufgelöste Verzweigungspunkte sind nicht markiert. Der Maßstab verdeutlicht 10% Sequenzunterschied.

Tab. III.1.5.1 Sequenzhomologien zufällig ausgewählter MCONC-negativer SJC- und SJD-Klone zu ihren phylogenetisch nächsten Verwandten.

Klon Nr.	Nächster phylogenetischer Verwandter	Accession Nr.	Homologie (%)
SJC-108a	rDNA Klon ABS4 (<i>Methanosarcina</i> -ähnlich)*	Y15387	98.8
SJC-92b**	rDNA Klon WCHD3-02	AF050616	89.7
SJC-133b [#]	rDNA Klon ABS4 (<i>Methanosarcina</i> -ähnlich)	Y15387	99.1
SJD-108	<i>Methanobacterium formicicum</i>	M36508	99.8
SJD-115	<i>Methanobacterium formicicum</i>	M36508	99.8
SJD-116	<i>Methanobacterium formicicum</i>	M36508	97.4

* Partiaalsequenz, *E. coli* Position 145-881. Daher keine Einbettung in Abb. III.1.5.2

** Partiaalsequenz, *E. coli* Position 112-637 und 807-1351

[#] Partiaalsequenz, *E. coli* Position 8-876

1.6 Zusammensetzung der 16S-rDNA-Genbibliotheken E-H und phylogenetische Klassifizierung einzelner Klonsequenzen durch vergleichende 16S-rDNA-Sequenzanalyse.

Im Dezember 1996, etwa zwei Jahre nach der ersten Probennahme und nach etwa viermonatigem kontinuierlichem Betrieb des Bioreaktors, wurden erneut insgesamt vier Proben entnommen. Die Probennahmen erfolgten vor (2.12.96 und 16.12.96) und nach (9.12.96 und 23.12.96) der Zudosierung von nitrathaltigem RAMM-Medium. Ausgehend von extrahierter und aufgereinigter Gesamt-DNA wurden die bakteriellen 16S-rRNA Gene PCR-amplifiziert, anschließend kloniert und vier 16S-rDNA-Genbibliotheken (E-H) mittels TA-Klonierung angelegt. Der Vergleich dieser rDNA-Genbibliotheken mit den bakteriellen rDNA-Genbibliotheken A und B (Januar 1995) sollte die Frage beantworten, ob eine Änderung der Kultivierungsbedingungen die Zusammensetzung der rDNA-Genbibliotheken beeinflusste. Aufgrund der bisherigen Beobachtung, daß etwa 80% der rekombinanten *E. coli*-Klone nach TA-Klonierung ein rDNA-Insert der erwarteten Länge enthielten, wurden von jeder der Genbibliotheken E-H jeweils 216 rekombinante Klone zufällig für die mit DIG-markierten 16S-rDNA-Fragmenten ausgewählt (SJE-, SJF-, SJG, SJH-Klone). Aus Gründen der Zeitersparnis wurde anstelle der bis dahin durchgeführten Dot-Blot-Hybridisierung die Colony-Slot-Blot-Hybridisierung eingesetzt. Die Hybridisierungen sowohl mit DIG-markierten 16S-rDNA-Fragmenten einzelner SJA-Klone als auch eines SJH-Klones sollten Auskunft über die Häufigkeit der jeweiligen Klonfamilien in den rDNA-Genbibliotheken geben. Wie aus Tab. III.1.6.1 ersichtlich, wurden Vertreter der Klonfamilie SJA-186 und der Klonfamilien SJA-46 und SJA-118 weder in Genbibliotheken, die die Zeitpunkte vor noch nach einer Zudosierung von Nitrat repräsentierten, nachgewiesen. Demgegenüber wurde die Klonfamilie SJA-19 vor und nach einer Zudosierung und Vertreter der Klonfamilie SJH-171 nach einer Zudosierung von Nitrat nachgewiesen.

Tab. III.1.6.1 Häufigkeiten einzelner Klonfamilien in den 16S-rDNA-Genbibliotheken A, B und E-H.

Hybridisierung mit rDNA- Fragment*	Häufigkeit positiver Klone in 16S-rDNA-Genbibliothek (in %)**					
	A	B	E	F	G	H
			(2.12.96)	(9.12.96)	(16.12.96)	(23.12.96)
SJA-46	4.8	3.1	-	-	-	-
SJA-19	4.1	3.1	ND	4.9 (144)	2.8 (72)	ND
SJA-173	1.4	0.6	- (144)	- (72)	- (72)	-
SJA-186	9.6	11.7	-	-	-	-
SJH-171	-	0.6	- (72)	ND	ND	1.4 (72)

* Hybridisierung mit DIG-markiertem 16S-rDNA-Fragment des angegebenen Klones.

** In Klammern in die Anzahl untersuchter Klone angegeben. Bei fehlender Angabe wurden alle 216 Klone hybridisiert.

ND Hybridisierung nicht durchgeführt.

Bei der Auswertung der Colony-Slot-Blot-Hybridisierungen erwies sich das Auftreten teilweise recht starker Hintergrundsignale bzw. falsch-positiver Hybridisierungssignale als störend. Ursache dafür waren offensichtlich mit der positiv geladenen Nylonmembran (Hybond N+) verbundene Stripping-Probleme. Da ähnliche Probleme ebenfalls bei positiv geladenen Nylonmembranen eines weiteren Herstellers (Boehringer Mannheim) zu beobachten waren, erscheint deren Verwendung für die Hybridisierung von rDNA-Klonen mit DIG-markierten 16S-rDNA-Fragmenten als wenig ratsam. Aufgrund der genannten Probleme wurden bei der Auswertung der Hybridisierungen lediglich sehr starke Signale als positiv gewertet und zusätzlich das Plasmid-Insert mindestens eines positiven Klons teilsequenziert. Dabei ergab ein Vergleich der SJA-19-positiven Klonsequenz SJF-22 mit SJA-19 einen Unterschied von 2 Basen (*E. coli* Position 611-1541) und der SJH-171-positiven Klonsequenz SJB-63 mit SJH-171 einen Unterschied von drei Basen (*E. coli* Position 8-1518).

2 Charakterisierung des TCB-dechlorierenden Konsortiums durch vergleichende Analyse abgeleiteter *nifH*-Sequenzen.

Eine kulturunabhängige Charakterisierung stickstofffixierender Mikroorganismen des TCB-dechlorierenden Konsortiums erfolgte durch Analyse direkt-amplifizierter *nifH*-Gene, die ein Schlüsselenzym der Stickstofffixierung, die Dinitrogenase-Reduktase (NifH-Protein), kodieren.

Rekombinante Klone der *nifH*-Genbibliotheken X,Y und Z wurden zufällig ausgewählt und die Länge der Inserts mittels PCR-Amplifizierung überprüft. Dabei zeigte sich, daß etwa 80% der rekombinanten Klone ein Insert der erwarteten Länge enthielten. Insgesamt wurden 20 *nifH*-Inserts sequenziert und zu 11 verschiedenen NifH-Proteinsequenzen umgelesen (SN-Sequenzen für **S**aale, **N**itrogen). Jede dieser elf SN-Sequenzen wies vier funktionell wichtige, konservierte Aminosäuren auf, die bisher in allen Dinitrogenase-Reduktasen gefunden wurden (Anhang VI.1). Dies sind die drei Cysteine Cys-39, Cys-86, und Cys-98 (*Azotobacter vinelandii* [P00459] Nummerierung) und das konservierte Arginin-101 (Arg-101). Da Cys-98 der Ligandierung der Eisen-Schwefel-Gruppe und Arg-101 der reversiblen Inaktivierung der Nitrogenase-Aktivität durch ADP-Ribosylierung dient (Dean und Jacobson, 1992), repräsentieren vermutlich alle SN-Sequenzen funktionelle Dinitrogenase-Reduktasen. Die vergleichende Sequenzanalyse zeigte, daß keine der SN-Sequenzen identisch war mit einer der in öffentlichen Datenbanken hinterlegten NifH-Proteinsequenzen. Jedoch waren die Aminosäuresequenzen SN-2, SN-4, und SN-16 bzw. SN-40 zu 92 und 93% identisch mit den NifH2- bzw. NifH1-Proteinsequenzen von *Methanosarcina barkeri* (Tab. III.2.1). Mit Ausnahme der Aminosäuresequenz SN-17, die eine engere Verwandtschaft zu bakteriellen NifH-Sequenzen aufwies, gruppieren alle übrigen SN-Sequenzen mit NifH-Sequenzen methanogener Archaea (Abb. III.2.1).

Tab. III.2.1 Identitäten zwischen den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der SN-Klone und bekannten, mikrobiellen NifH-Proteinsequenzen*.

	NifH-Sequenzidentität (%)																								
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.	22.	23.	24.	25.
1. SN-2																									
2. SN-4	99																								
3. SN-8	54	54																							
4. SN-10	53	53	98																						
5. SN-12	58	58	61	61																					
6. SN-13	50	50	56	56	62																				
7. SN-16	99	98	55	54	57	50																			
8. SN-17	67	67	49	48	54	52	67																		
9. SN-33	54	54	60	60	65	60	54	54																	
10. SN-40	67	66	47	46	55	51	68	66	51																
11. SN-42	53	53	99	98	61	55	53	46	60	44															
12. MetBa2	93	92	52	50	55	49	92	69	55	63	49														
13. MetBa1	66	66	44	43	52	51	67	66	49	92	42	63													
14. MetTh1	65	65	49	48	55	51	66	66	52	72	46	64	68												
15. AzoV11	68	68	54	53	56	56	69	82	55	66	51	67	65	66											
16. DesGig	76	75	54	52	56	52	75	71	58	65	51	76	63	63	67										
17. FraSpe	65	65	50	49	58	53	64	75	52	67	48	65	67	61	80	65									
18. KlePne	67	67	52	52	55	53	68	85	54	65	50	67	63	66	93	67	78								
19. RhiLeg	69	69	53	51	52	50	69	81	54	64	51	67	64	59	78	64	79	74							
20. PleBof	48	48	50	50	46	46	49	47	48	50	49	44	49	45	49	47	44	47	47						
21. MetTh2	54	54	59	59	62	59	54	55	65	53	59	53	52	51	56	53	55	54	53	50					
22. AzoTol	60	60	45	44	47	44	61	78	48	58	44	60	58	59	76	59	72	78	85	41	45				
23. MetJan	60	60	56	55	61	52	61	62	58	59	55	57	56	59	61	63	58	60	59	50	57	55			
24. TKY1	53	53	53	53	60	54	53	47	68	49	54	53	50	50	52	49	50	50	47	47	61	41	50		
25. TKY19	49	49	64	63	57	54	49	45	57	46	64	47	44	43	48	49	44	47	47	49	52	42	54	53	
26. MetIva	57	57	52	52	57	55	58	54	53	56	50	55	54	53	56	52	52	54	55	48	53	47	64	48	51

* Die Berechnung erfolgte anhand des in Anhang VI.2 gezeigten Alignments. Die maximalen Sequenzidentitäten sind fett markiert. AzoV11, *Azotobacter vinelandii* NifH1; MetBa2, *Methanosaerina barkeri* NifH2; MetBa1, *M. barkeri* NifH1; MetTh1, *Methanococcus thermolithotrophicus* NifH1; DesGig, *Desulfovibrio gigas*; FraSpe, *Frankia* sp. strain FAC1; KlePne, *Klebsiella pneumoniae*; RhiLeg, *Rhizobium leguminosarum*; PleBof, *Plectonema boryanum* Chlorophyll Eisen Protein *fxC*; MetTh2, *Methanococcus thermolithotrophicus* NifH2; AzoTol, *Azoarcus toluyliticus* Stamm Td-1; MetJan, *Methanococcus jannaschii*; TKY1, PCR-Klon TKY1 (Ohkuma et al., 1996); TKY19, PCR-Klon TKY19 (Ohkuma et al., 1996); MetIva, *Methanobacterium ivanovii*.

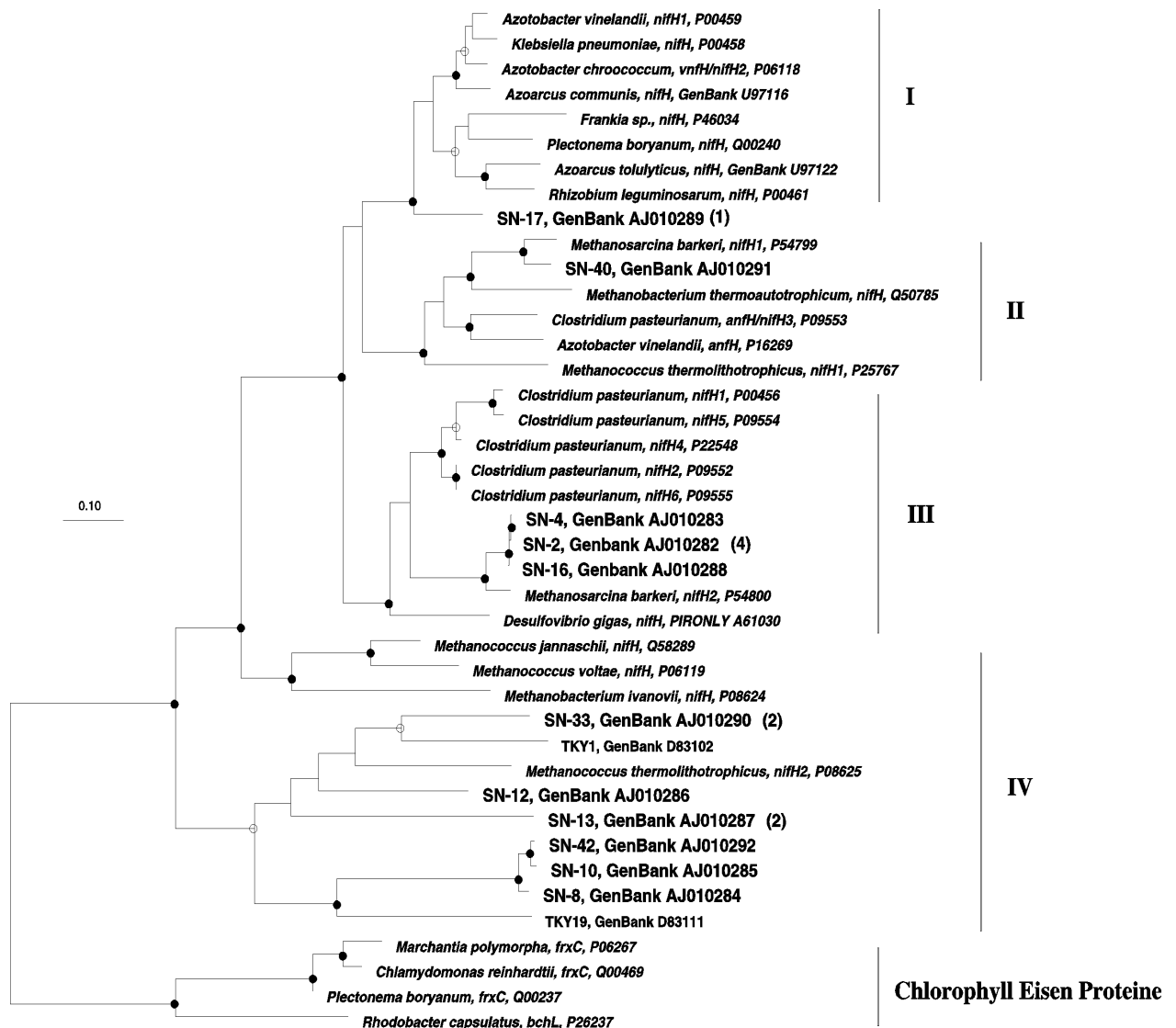


Abb. III.2.1 Nach der Neighbor-Joining Methode generiertes phylogenetisches Dendrogramm der aus *nifH*-Genfragmenten abgeleiteten Proteinsequenzen (SN-Sequenzen). Die Analyse beruhte auf dem Vergleich partieller NifH-Proteinsequenzen (113 Aminosäuren; Pos. 17-129, *Azotobacter vinelandii* [P00459]) kultivierter Bakterien und Archaea sowie zweier bisher nicht kultivierter Mikroorganismen (TKY-Sequenzen; Ohkuma et al., 1996). Die Sequenzen von vier Chlorophyll Eisen Proteinen wurden als Bezugsgruppe einbezogen. Die Benennung der Sequenzcluster erfolgte nach Chien und Zinder (1994). In Klammern sind zusätzliche identische Klonsequenzen angegeben. Die Zuverlässigkeit des Verzweigungsmusters wurde durch eine Bootstrap-Analyse mit 100-facher Replikation überprüft. Signifikante Verzweigungspunkte (Bootstrapwerte >74%) sind mit einem schwarzen Punkt markiert. Verzweigungspunkte mit Bootstrapwerten zwischen 50 und 74% sind mit einem Kreis markiert. Nicht aufgelöste Verzweigungspunkte sind unmarkiert. Ein nach der Parsimony-Methode generiertes Dendrogramm zeigte ein identisches Verzweigungsmuster. Der Maßstab verdeutlicht 10% Sequenzunterschied.

3 Gezielte Isolierung und Kultivierung von Bakterien des TCB-dechlorierenden Konsortiums.

Ausgehend von der phylogenetischen Klassifizierung einzelner 16S-rDNA-Klonsequenzen und den daraus abgeleiteten möglichen metabolischen Eigenschaften (s. Diskussion) wurde versucht, drei Organismengruppen gezielt aus der Mischkultur des Bioreaktors anzureichern und zu kultivieren.

1. Fakultativ aerobe, acetat- oder benzoatverwertende Bakterien
2. Nitratreduzierende, acetatverwertende Bakterien
3. Selenatreduzierende Bakterien

Alle Anreicherungsansätze führten zu einer Reihe von Reinkulturen, die mittels vergleichender 16S-rDNA-Sequenzanalyse charakterisiert wurden.

3.1 Isolierung und Charakterisierung fakultativ aerober und nitratreduzierender Bakterien

Insgesamt wurden jeweils zwei Reinkulturen gewonnen, die aerobes Wachstum auf OLA- bzw. OLB-Agarmedium zeigten. Sie wurden nach dem entsprechenden Anreicherungsmedium OLA-1 und OLA-2 bzw. OLB-1 und OLB-2 benannt. Desweiteren wurden sieben Reinkulturen gewonnen, die anaerobes Wachstum auf RNA-Agarmedium zeigten. Sie wurden RNA-111, RNA-112, RNA-212, RNA-1131, RNA-2111, RNA-3121 und RNA-3111 benannt. Die Reduktion von Nitrat in den flüssigen Anreicherungskulturen mit RNA-Medium konnte durch das Absinken der Nitratkonzentration von ursprünglich über 500 mg/ml bis unter die Nachweisgrenze der verwendeten Merck-Teststäbchen (10 mg/ml) gezeigt werden. Für die nachfolgende Charakterisierung dieser Isolate wurden die nahezu vollständigen 16S-rRNA Gene der Isolate mit den Primerkombinationen TPU1/RTU8 oder TPU1-M13F/RTU8-M13R PCR-amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Verwendung der Primerkombination TPU1-M13F/RTU8-M13R ermöglichte den Einsatz der universellen Primer M13(21)F und M13(24)R in der DNA-Sequenzierung was aufgrund der standardisierbaren Reaktionsbedingungen eine wesentliche Vereinfachung gegenüber der Verwendung spezifischer rDNA-Primer darstellte. Die vergleichende Analyse der nahezu vollständigen 16S-rDNA-Sequenzen von drei Isolaten zeigte die enge Beziehung mit Vertretern der Gattung *Pseudomonas* innerhalb der γ -Untergruppe der Proteobakterien (Abb. III.3.1.1).

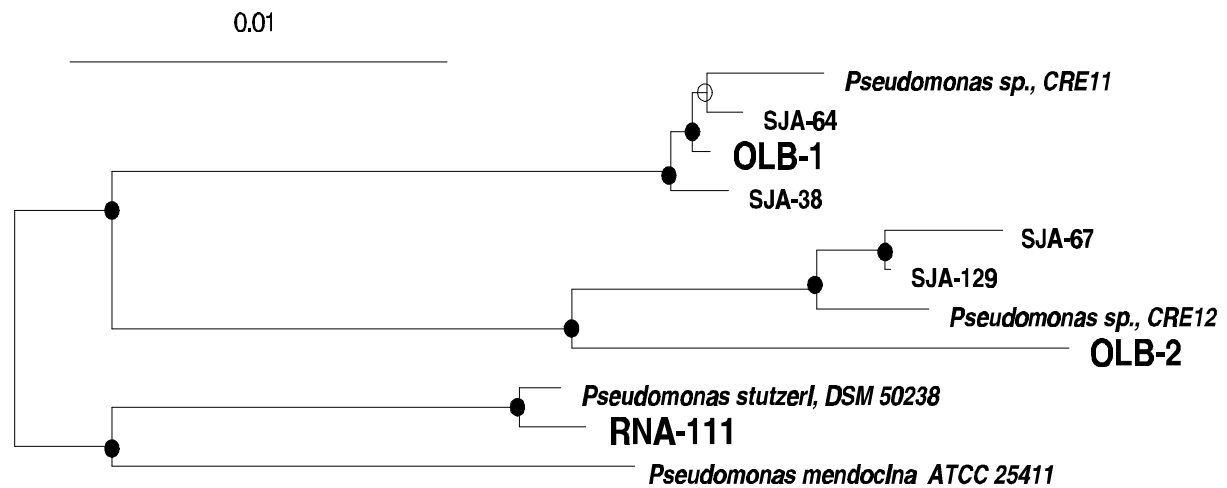


Abb. III.3.1.1 Phylogenetische Beziehung der Isolate OLB-1, OLB-2 und RNA-111 innerhalb der Gattung *Pseudomonas* basierend auf dem Vergleich nahezu vollständiger 16S-rDNA-Sequenzen (min. 1400 bp). Die Zuverlässigkeit des Verzweigungsmusters wurde durch eine Bootstrap-Analyse mit 200-facher Replikation überprüft. Signifikante Verzweigungspunkte (Bootstrapwerte >74%) sind mit einem schwarzen Punkt markiert. Verzweigungspunkte mit Bootstrapwerten zwischen 50 und 74% sind mit einem Kreis markiert. Die Klone SJA-38 und SJA-64 wiesen einen Sequenzunterschied von zwei bzw. einer Base gegenüber der 16S-rDNA des Isolates OLB-1 auf (*E. coli* Position 41-1501). Demgegenüber waren die Klonsequenzen SJA-67 und SJA-129 lediglich zu 97.5 bzw. 97.8% homolog mit der 16S-rDNA des Isolates OLB-2. Der Maßstab verdeutlicht 1% Sequenzunterschied.

Die vergleichende 16S-rDNA-Sequenzanalyse der verbleibenden acht Isolate basierte aufgrund der geringen Sequenzunterschiede mit den Isolaten OLB-1 bzw. OLB-2 lediglich auf Partialsequenzen (Tab. III.3.1.1).

Tab. III.3.1.1 16S-rDNA-Sequenzhomologien der acht partiell sequenzierten OLA- und RNA-Isolate mit den Isolaten OLB-1 und OLB-2.

Isolat	Sequenzierte 16S-rRNA <i>E. coli</i> Positionen	Höchste Homologie mit Isolat	Sequenzhomologie (%)
OLA-1	337-1518	OLB-2	99.7
OLA-2	298-1486	OLB-1	99.8
RNA-112	1122-1520	OLB-2	99.2
RNA-212	971-1518	OLB-2	99.4
RNA-1131	540-1502	OLB-2	100
RNA-2111	30-1512	OLB-2	99.8
RNA-3111	489-1512	OLB-2	99.2
RNA-3121	592-1512	OLB-2	99.9

3.2 Isolierung und Charakterisierung selenatreduzierender Bakterien

Insgesamt wurden 25 Reinkulturen (Se-Isolate) gewonnen, die neben anaerobem Wachstum auf nitrathaltigem Medium (SN- oder SNS-Medium) auch auf SS0.1-, SS0.4-, S40S0.4- oder SSGY0.4-Agarplatten Zellwachstum zeigten und eine deutliche Rotfärbung der Kolonien aufwiesen (Abb. III.3.2.1). Dabei war auffällig, daß besonders bei nitrathaltigem Medium diese Rotfärbung erst einige Zeit nach dem Auftreten makroskopisch sichtbarer Kolonien beobachtet werden konnte. Beim Überimpfen von Zellmaterial zeigte sich, daß die Rotfärbung der Kolonien entweder aus einem roten Niederschlag im Agar herrührte, wobei die Kolonien weißlich/farblos waren, oder aber das Zellmaterial selbst rötlich gefärbt war. Mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie konnte gezeigt werden, daß dieser rötliche Niederschlag durch elementares, wasserunlösliches Selen verursacht wurde. Dazu wurde der Festanteil einer Flüssigkultur (Isolat Se-34) durch Zentrifugation abgetrennt und Selen in dem gewaschenen Pellet qualitativ und quantitativ bestimmt (s. Anhang VI.3). Durch diesen Ansatz war es zugleich möglich den Zusammenhang zwischen Zellwachstum und gebildetem Selen zu bestimmen und somit Hinweise auf eine mögliche Selenat-Respiration zu erhalten (s. Diskussion).

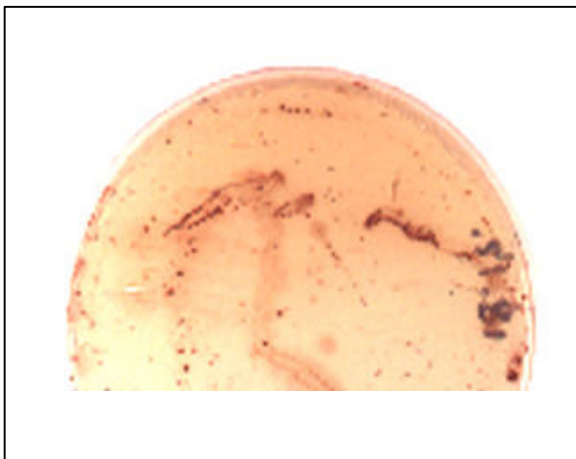


Abb. III.3.2.1 Kolonien selenatreduzierender Bakterien auf einer Agarplatte mit SN-Medium nach mehrwöchiger Inkubation. Ausgefallenes, elementares Selen verursacht die auftretende Rotfärbung.

Die vergleichende 16S-rDNA-Sequenzanalyse von 14 Isolaten ergab eine Einteilung in fünf rDNA-Homologiegruppen (Tab. III.3.2.1). Wie aus Abb. III.3.2.2 ersichtlich, zeigten die fünf repräsentativen Isolate keine nähere phylogenetische Verwandtschaft zu einer der SJA-Sequenzen oder zu Sequenzen bereits bekannter selenatrespirierenden Bakterien wie *Thauera selenatis* oder "*Geospirillum barnesi*" (s. Diskussion). Jedoch wiesen die 16S-rDNA-Sequenzen der Isolate OLB-1 und Se-41 eine 100%ige Übereinstimmung auf.

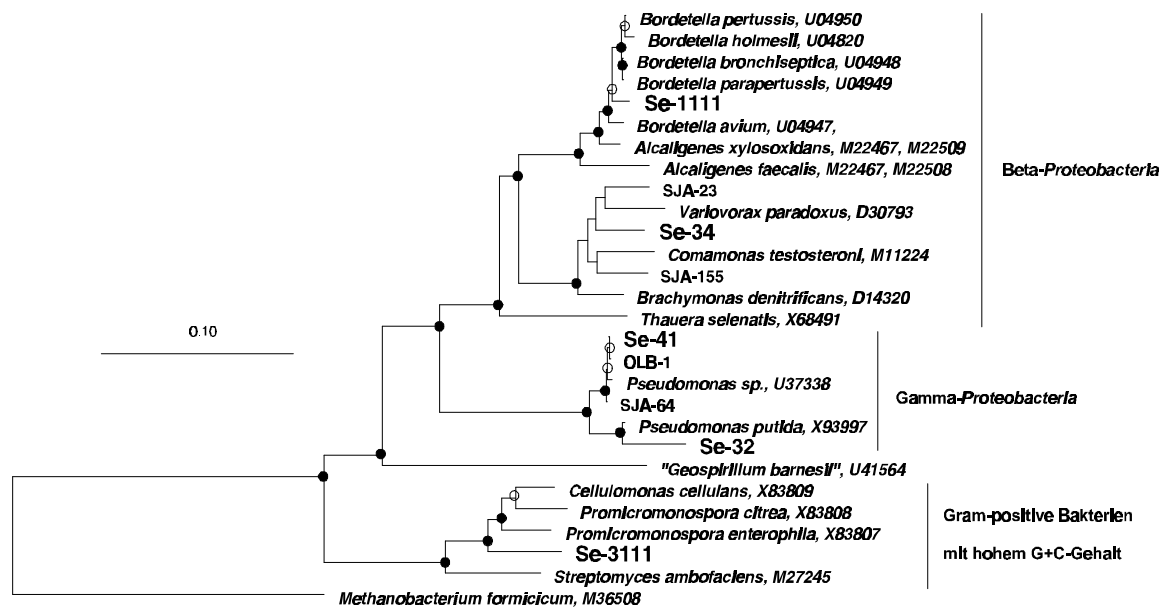


Abb. III.3.2.2 Phylogenetische Beziehung fünf repräsentativer selenatreduzierender Isolate. Die Zuverlässigkeit des Verzweigungsmusters wurde durch eine Bootstrap-Analyse mit 100-facher Replikation überprüft. Signifikante Verzweigungspunkte (Bootstrapwerte >74%) sind mit einem schwarzen Punkt markiert. Verzweigungspunkte mit Bootstrapwerten zwischen 50 und 74% sind mit einem Kreis markiert. Nicht aufgelöste Verzweigungspunkte sind unmarkiert. Die 16S-rDNA-Sequenz von *Methanobacterium formicicum* dient als Außengruppe. Der Maßstab verdeutlicht 10% Sequenzunterschied.

Tab. III.3.2.1 16S-rDNA-Homologiegruppen selenatreduzierender Isolate.

rDNA-Homologiegruppe*	Isolate**	Sequenzierte <i>E. coli</i> 16S-rRNA-Positionen
Se-32	-	-
Se-34	Se-31	28-921
	Se-35	67-1100
	Se-36	43-1053
	Se-45	54-966
Se-41	Se-7	105-1060
	Se-33	29-1249
Se-1111	-	-
Se-3111	Se-1311A	601-1505
	Se-13111	90-1440

* Die Isolate mit vollständig bestimmter 16S-rDNA-Sequenz sind angegeben.

** Alle Isolate einer Homologiegruppe besitzen 100% Homologie mit dem repräsentativen Isolat.

4 Nachweis bisher nicht kultivierter Bakterien des TCB-dechlorierenden Konsortiums mittels 16S-rRNA-gerichteter Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Für den Nachweis bisher nicht kultivierter Bakterien mittels 16S-rRNA-gerichteter FISH wurden zwei SJA-Klonfamilien ausgewählt, die entweder mit sehr hoher (SJA-186) oder sehr geringer Häufigkeit (SJA-118) in den rDNA-Genbibliotheken A und B vertreten waren. Um die von den Klonfamilien SJA-118 und SJA-186 repräsentierten Bakterien mittels 16S-rRNA-gerichteter FISH in Bioreaktormaterial nachzuweisen, wurden die Oligonukleotidsonden 118+ und 186+ entwickelt. Im computergestützten Vergleich mit über 5000 16S-rRNA-Sequenzen waren beide Sonden ausschließlich zu Vertretern der jeweiligen Klonfamilien vollständig komplementär. Die Spezifität dieser Sonden gegenüber den restlichen SJA-Klonen wurde in der Dot-Blot-Hybridisierung getestet. Beide DIG-markierten Sonden hybridisierten unter stringenten Bedingungen (50 °C, 6 x SSC) nur mit Klonen der jeweiligen Klonfamilien (Daten nicht gezeigt). Die Sonde 118+ wies mindestens drei Basenfehlpaarungen mit den 16S-rRNA-Sequenzen einer Reihe gram-positiver Bakterien auf (*Rhodococcus* spp., *Oenococcus* spp., *Bacillus* spp.). Auf die Verwendung dieser Bakterien als Negativkontrolle in der In-situ-Hybridisierung wurde verzichtet, da die Penetration der Oligonukleotide durch die Zellwand Gram-positiver Bakterien häufig erschwert ist und es somit zu falsch-negativen Ergebnissen kommen kann (Roller et al., 1994; Schuppler et al., 1998). Stattdessen wurde das Gram-negative Bakterium *Flectobacillus major* eingesetzt, dessen 16S-rRNA-Sequenz vier Basenfehlpaarungen mit der Sonde 118+ aufwies. Die Sonde 186+ zeigte mindestens zwei Basenfehlpaarungen mit den 16S-rRNA-Sequenzen einer Reihe Gram-negativer Bakterien. Als Negativkontrolle für die In-situ-Hybridisierung wurde *Burkholderia cepacia* eingesetzt (zwei Basenfehlpaarungen).

Bei einer Formamidkonzentration von 23% im Hybridisierung-Puffer zeigten beide fluoreszenzmarkierten Sonden (118+ und 186+) keine Signale bei den mitgeführten Kontrollstämmen. Beide Sonden zeigten jedoch in Biofilmmaterial, das von bewachsenen Polyurethanschaumkörpern abgelöst wurde (Probennahme 2.12.96), unter stringenten Bedingungen ein deutliches Fluoreszenzsignal (Abb. III.4.1). Eine Bestimmung der Keimzahl mittels 16S-rRNA-gerichteter FISH erwies sich allerdings als schwer durchführbar, da im mikroskopischen Bild keine typischen bakteriellen Einzelzellen sondern meist flockenartig zusammengelagerte Aggregate sichtbar

waren. Diese Signale waren nicht immer eindeutig von Autofluoreszenzsignalen verunreinigender Partikel zu unterscheiden. Desweiteren erwies sich die Ablösung des Aufwuchses von den Polyurethanschaumkörpern mittels Vortexen oder Abziehen mit einer Pipette als problematisch, da beides i.d.R. zu einer Zerstörung des gewachsenen Biofilms führte. Auch Semidünnschnitte von zuvor in wasserlöslichem Kunststoff eingebetteten Biofilmmaterial führten nicht zu befriedigenden Ergebnissen. Aus den genannten Gründen wurde daher vorerst auf eine weitergehende Untersuchung des Bioreaktormaterials mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung verzichtet.

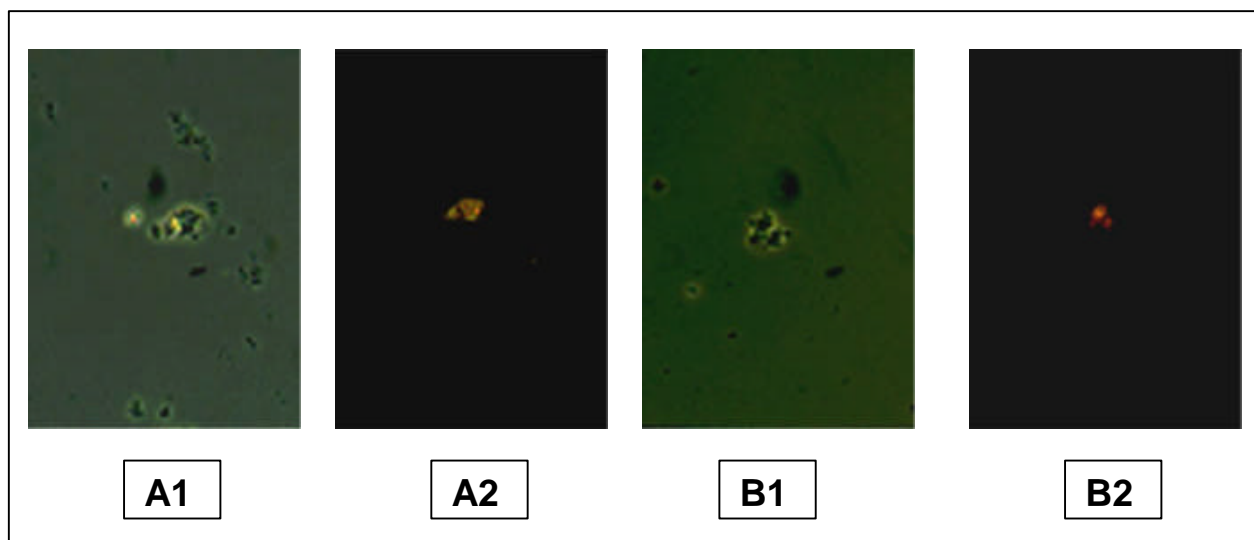


Abb. III.4.1 In-situ-Hybridisierung von Biofilmmaterial mit den für die Klonfamilien SJA-118 und SJA-186 spezifischen Oligonukleotidsonden 118+ und 186+. Ein zum gleichen Zeitpunkt entnommener Aufwuchskörper diente als Ausgangsmaterial für die Anlage der Genbibliothek E (2.12.96). Die Hybridisierung mit den Cy3-markierten Oligonukleotidsonden erfolgte als Doppelhybridisierung mit der FITC-markierten, bakterienspezifischen Oligonukleotidsonde EUB338 bei einer Formamidkonzentration von 23%. [A1] Phasenkontrastaufnahme einer Biofilmflocke. [A2] Epifluoreszenzaufnahme des gleichen Bildausschnittes nach Hybridisierung mit Sonde Cy3-118+. [B1] Phasenkontrastaufnahme einer weiteren Biofilmflocke. [B2] Epifluoreszenzaufnahme des gleichen Bildausschnittes nach Hybridisierung mit Sonde Cy3-186+. Bereiche der Biofilmflocke, die ein Fluoreszenzsignal der spezifischen Sonden zeigten, wiesen auch ein Signal der FITC-markierten Sonde EUB338 sowie ein DAPI-Signal auf (Daten nicht gezeigt).

IV DISKUSSION

1 Bestimmung mikrobieller Diversität mittels kulturunabhängiger, molekulargenetischer Methoden

Bisher ist nur ein geringer Teil der in der Umwelt vorkommenden Bakterien und Archaea als in-vitro Reinkultur zugänglich. Lediglich 0.1-15% der mikrobiellen Populationen in komplexen Habitaten, wie Boden, Fluß- und Meeressediment oder Belebtschlamm sind mit den bisher bekannten Methoden der Anreicherung und Isolierung kultivierbar, wie ein Vergleich mit den mikroskopisch bestimmten Keimzahlen ergibt (Amann et al., 1995). Der Grund für diese von Staley und Konopka (1985) als „great plate count anomaly“ bezeichnete Diskrepanz, die zu einer Verzerrung unseres Umweltbildes führt, ist die unzureichende Kenntnis natürlicher Interaktionen in mikrobiellen Lebensgemeinschaften, die die Wahl entsprechender physiologischer Bedingungen im Labor und somit eine erfolgreiche in-vitro Kultivierung erschwert. Für die Bestimmung der mikrobiellen Diversität eines komplexen Habitats sind somit kulturabhängige Methoden allein nicht ausreichend; vielmehr ist ein experimentelles Vorgehen erforderlich, das alle bisher kultivierten aber auch die nicht kultivierten Mikroorganismen erfaßt.

Die Entwicklung molekulargenetischer Techniken wie die in-vitro Amplifikation und Klonierung von Nukleinsäurefragmenten sowie deren Sequenzierung ermöglicht heute eine kulturunabhängige Charakterisierung auf molekularer Ebene. Seit den grundlegenden Arbeiten von Carl Woese (zur Übersicht s. Woese, 1987) werden vor allem ribosomale RNAs oder die kodierenden Gene für eine phylogenetische Klassifizierung bzw. molekulare Typisierung von Mikroorganismen eingesetzt. Aufgrund ihrer zentralen Bedeutung in der Nukleinsäuretranslation sind diese Moleküle ubiquitär verbreitet und besitzen eine weitgehend konservierte Struktur. In der Primärstruktur wechseln sich stark konservierte Bereiche, die bei nahezu allen Organismen identisch sind, mit weniger stark oder kaum konservierten, variablen Bereichen ab, die meist ausreichend Sequenzunterschiede aufweisen, um einzelne Spezies zu unterscheiden. Die Verwendung von Oligonukleotidprimern, die gegen stark konservierte Bereiche der rRNA-Gene gerichtet sind, erlaubt die PCR-Amplifikation und anschließende Klonierung der rRNA-Gene nahezu aller Vertreter der Bakterien und Archaea. Diese universelle Amplifikation ermöglicht auch eine Analyse von bisher unkultivierten Organismen und damit bedeutet dieser Ansatz eine

neue Qualität bei der Beschreibung mikrobieller Diversität in komplexen Ökosystemen (Göbel, 1995). So zeigten etwa Untersuchungen an Boden (Liesack und Stackebrandt, 1992; Bornemann et al., 1996), Torf (Rheims et al., 1996), Belebtschlamm (Schuppler et al., 1995; Snaidr et al., 1997), heißen Quellen (Barns et al., 1994; Hugenholtz et al., 1998) oder einer Parodontitis-Läsion (Choi et al., 1994), daß sich die Mehrzahl mikrobieller Lebensgemeinschaften nahezu vollständig aus bisher unkultivierten Bakterien bzw. Archaea zusammensetzen. Zahlreiche dieser nur anhand der rDNA-Sequenz charakterisierten Mikroorganismen sind phylogenetisch nah mit bereits bekannten Mikroorganismen verwandt und lassen sich bestehenden Taxa zuordnen. Nicht selten repräsentieren rDNA-Sequenzen jedoch unkultivierte Mikroorganismen neuer Taxa, für die bisher keine oder nur wenige kultivierte Vertreter beschrieben wurden (Hugenholtz et al., 1998a). Auch aus dem hier untersuchten TCB-dechlorierenden Konsortium wurden rDNA-Sequenzen isoliert (SJA-4, SJA-22, SJA-43, SJA-121, SJA-171 und SJA-176), die sich solchen als Phylum Cluster bezeichneten Entwicklungslinien zuordnen lassen. Aufgrund der enormen phylogenetischen Diversität bzw. Vielfalt mikrobieller 16S-rDNA-Sequenzen ist der sog. „top-to-bottom-approach“ (Amann et al., 1995) zur Analyse komplexer mikrobieller Habitate als eine Ergänzung, nicht aber als Ersatz der vergleichenden Sequenzanalyse direkt amplifizierter 16S-rRNA-Gene zu sehen. In diesem Ansatz werden gruppenspezifische, 16S-rRNA-gerichtete Oligonukleotidsonden, die Taxa unterschiedlicher Hierarchien erfassen, in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung eingesetzt, um eine schnelle Analyse mikrobieller Populationen zu ermöglichen. Es ist jedoch zu beachten, daß die Entwicklung gruppenspezifischer Sonden immer auf einem Datensatz bereits bekannter rRNA-Sequenzen basiert. Somit gestattet auch die simultane Verwendung von Sonden mit gestaffelter Spezifität (z.B. Gattungs- und Spezies-Spezifität) lediglich den Nachweis bekannter rRNA-Sequenzen und kann höchstens durch das Ausbleiben eines Doppelnachweises einen indirekten Hinweis auf die Anwesenheit neuer, unbekannter Mikroorganismen geben. Demgegenüber ermöglicht die Verwendung hochkonservierter Amplifikationsprimer bei der PCR die Erfassung nahezu aller mikrobiellen 16S-rDNA-Sequenzen die durch nachfolgende Klonierung und Sequenzierung eindeutig phylogenetisch klassifiziert werden können.

1.1 Einfluß experimenteller Faktoren auf die Bestimmung der mikrobiellen Diversität des TCB-dechlorierenden Konsortiums mittels direkter, PCR-vermittelter Analyse ribosomaler RNA-Gene

Obwohl die PCR-vermittelte Analyse ribosomaler RNA-Gene zur Charakterisierung mikrobieller Reinkulturen inzwischen zu einer Standardmethode geworden ist (Weisburg et al., 1991; Stackebrandt et al., 1992), treten bei der kulturunabhängigen Analyse von Mischpopulationen eine Reihe von Problemen auf, die zu einer fehlerhaften Bestimmung der mikrobiellen Diversität führen können (zur Übersicht s. von Wintzingerode et al., 1997). Neben der Inhibition der PCR-Amplifikation durch koextrahierte Kontaminanten, wie etwa Huminsäuren und der Bildung artifizieller PCR-Produkte sind dies vor allem die unterschiedlichen Amplifikations- und Klonierungseffizienzen einzelner rDNA-Moleküle. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, diese Fehlermöglichkeiten zu umgehen bzw. zu reduzieren. So diente die Isolierung hochmolekularer DNA aus der Gesamt-DNA Präparation zum einen der Abtrennung PCR-inhibierender Kontaminanten, zum anderen konnte damit die Verwendung fragmentierter Template-DNA, die die Bildung von Sequenzchimären in der nachfolgenden PCR-Amplifizierung der 16S-rDNA forciert, verhindert werden (Pääbo et al., 1990; Liesack et al., 1991). Diese artifiziellen PCR-Produkte, die aus der rDNA zweier Organismen zusammengesetzt sind, können auch als Folge einer unvollständigen Strangsynthese während der PCR-Elongationsschritte entstehen (Wang und Wang, 1996). Ihre Häufigkeit läßt sich durch eine Verlängerung der Elongationszeit während der PCR deutlich reduzieren (Meyerhans et al., 1990; Wang und Wang, 1996). Daher wurden für die Amplifizierung ribosomaler DNA von Bakterien und Euryarchaeota aus der Gesamt-DNA des TCB-dechlorierenden Konsortiums Elongationszeiten zwischen zwei und fünf Minuten gewählt. Bei einer Syntheseleistung der *Taq*DNA-Polymerase von 60-125 Nukleotiden/s (Gelfand, 1992) und einer Amplikonlänge zwischen 1000 und 1550 bp entspricht dies einer mindestens vierfachen Erhöhung der nötigen Elongationszeit. Unter den 52 untersuchten vollständig sequenzierten SJA-Klonen wurde eine chimäre Sequenz nachgewiesen, was einer Häufigkeit von etwa 2% entspricht. In vergleichbaren Untersuchungen komplexer mikrobieller Habitate wurden Sequenzchimären mit Häufigkeiten zwischen 5.4 und 8.6% nachgewiesen (Choi et al., 1994; Godon et al., 1997). Die geringere Frequenz chimärer rDNA-Sequenzen in der vorliegenden Arbeit könnte die Folge der Verwendung hochmolekularer DNA und der Verlängerung der

Elongationszeit in der PCR sein. Denkbar ist aber auch, daß mit dem verwendeten CHECK_CHIMERA-Programm bzw. dem Vergleich phylogenetischer Dendrogramme, denen überlappende Bereiche der 16S-rRNA zugrunde lagen, nicht alle chimären Sequenzen erkannt wurden (Robison-Cox et al., 1995). Neben dem Auftreten von Sequenzchimären, die eine unnatürlich hohe Diversität vortäuschen, kann die bevorzugte Amplifizierung und/oder Klonierung einzelner rDNA-Moleküle zu einer Überrepräsentation in den angelegten Genbibliotheken führen. Die Ursachen für eine bevorzugte PCR-Amplifizierung können vielfältig sein. Neben der Genomgröße und der Anzahl der *rrn*-Genkopien (Farrelly et al., 1995), sind die Wahl der Amplifikationsprimer (Suzuki und Giovannoni, 1996; Rainey et al., 1994, Hansen et al., 1998), der G+C-Gehalt der rDNA (Reysenbach et al., 1994) und die Konzentration der Template-DNA (Chandler et al., 1997) als mögliche Ursache beschrieben. Die Gründe für eine bevorzugte Klonierung von rDNA, wie sie von Rainey et al. (1994) berichtet wird, sind weitgehend unbekannt. Die Vielzahl der experimentellen Faktoren, die eine Überrepräsentation einzelner rRNA-Gene in einer Genbibliothek bewirken können, erschweren die Entwicklung eines weitgehend fehlerfreien Ansatzes und damit einer der Wirklichkeit entsprechenden Beschreibung des Biotops. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher für die PCR-Amplifizierung und Klonierung der 16S-rDNA von Bakterien und Euryarchaeota jeweils zwei verschiedene Ansätze gewählt und die resultierenden Genbibliotheken miteinander verglichen. Die Analyse der Genbibliotheken A und B zeigte, daß geringe Unterschiede in den PCR-Bedingungen und die Verwendung verschiedener Klonierungssysteme die Repräsentanz einiger rDNA-Sequenzen beeinflussten jedoch nicht zu einer generell unterschiedlichen Zusammensetzung führten. Ein signifikanter Einfluß der experimentellen Faktoren auf die Struktur der Genbibliotheken C und D konnte ebenfalls nicht beobachtet werden, wenngleich Unterschiede von etwa 30% in der Häufigkeit der dominierenden *Methanosaeta concilii*-ähnlichen rDNA-Sequenzen zu beobachten waren. Diese Ergebnisse stimmen mit unabhängigen Untersuchungen überein, die zeigen, daß die Analyse von 16S-rDNA-Genbibliotheken keine exakte Quantifizierung der Gesamtpopulation, sondern die Charakterisierung der abundanten Mikroorganismen eines komplexen mikrobiellen Ökosystems erlaubt (Cary et al., 1997; Snaidr et al., 1997).

1.2 Analyse bakterieller rDNA-Genbibliotheken mittels Hybridisierung mit PCR-amplifizierten, DIG-markierten rDNA-Fragmenten

Aufgrund der komplexen Zusammensetzung der rDNA-Genbibliotheken A und B mußte als Ergänzung zur Sequenzierung einzelner Klone eine geeignete Screening-Methode gefunden werden. Üblicherweise werden zu diesem Zweck entweder gruppen- und klonspezifische Oligonukleotidsonden in der Dot-Blot-Hybridisierung eingesetzt (Liesack und Stackebrandt, 1992; Rheims et al., 1996; Snaidr et al., 1997) oder die Klone mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) untersucht (Weidner et al., 1996). Die Verwendung von Oligonukleotiden erfordert jedoch zum einen die arbeitsaufwendige Optimierung der individuellen Hybridisierungsbedingungen, zum anderen müssen für die Entwicklung klonspezifischer Oligonukleotidsonden bereits eine Reihe von Klonsequenzen bekannt sein. Die RFLP-Analyse hingegen ist verglichen mit der Hybridisierung mit klonspezifischen Oligonukleotidsonden weniger spezifisch. Aus diesem Grund wurde die Hybridisierung mit PCR-amplifizierten, DIG-markierten rDNA-Fragmenten zum Nachweis identischer oder sehr ähnlicher rDNA-Klone entwickelt. Diese Methode besitzt die folgenden Vorteile: (i) mit einer Ausnahme hybridisierten die getesteten rDNA-Fragmente lediglich mit rDNA-Klonen, die eine Sequenzübereinstimmung von über 95.9% besaßen. Dies erlaubte einen präzisen Vergleich der beiden Genbibliotheken A und B. (ii) Die Entwicklung spezifischer Sonden erforderte keinen zusätzlichen Sequenzieraufwand. (iii) Für alle getesteten rDNA-Fragmente konnten nahezu identische Hybridisierungs- und Waschbedingungen gewählt werden.

1.3 Rückschlüsse auf den Metabolismus der unkultivierten Mikroorganismen des TCB-dechlorierenden Konsortiums nach vergleichender 16S-rDNA-Sequenzanalyse

Wie in nahezu allen vergleichbaren Untersuchungen komplexer mikrobieller Ökosysteme ist keine der SJ-Klonsequenzen mit einer der in öffentlichen Datenbanken hinterlegten 16S-rRNA-Sequenzen identisch. Jedoch wurde eine Reihe der Klonsequenzen phylogenetischen Gruppen bereits beschriebener kultivierbarer Organismen zugeordnet, die einen identischen oder zumindest sehr ähnlichen Energiemetabolismus zeigen. In Analogie ist daher anzunehmen, daß die bisher nur durch ihre 16S-rDNA-Sequenz charakterisierten, unkultivierten Organismen ebenfalls diese physiologischen Eigenschaften besitzen. So repräsentiert die Klonfamilie SJA-

186 wahrscheinlich unkultivierte Vertreter der Gattung *Thauera*. Bei den beiden bisher beschriebenen Spezies *T. aromatica* und *T. selenatis* handelt es sich um fakultativ anaerobe, denitrifizierende bzw. selenatreduzierende Bakterien (Anders et al., 1995; Macy et al., 1993; Song et al., 1998). Die Klonfamilien SJA-21, SJA-62 und SJA-23 repräsentieren jeweils Vertreter der durch einen aeroben bzw. fakultativ anaeroben Energiemetabolismus charakterisierten Gattungen *Zoogloea* (Shin et al., 1993), *Variovorax* (Willems et al., 1991) und einer taxonomisch noch nicht definierten Gruppe aerober Bakterienisolate (Bradford et al., 1996; Kalmbach et al., 1997). Neben den genannten SJA-Klonfamilien, die der β -Unterklasse der Proteobacteria zugeordnet wurden, repräsentierten alle SJA-Sequenzen der γ -Unterklasse unkultivierte Vertreter der Gattung *Pseudomonas*, deren beschriebene Spezies meist fakultativ anaerob sind (Palleroni, 1992). Vermutlich sind aerobe oder fakultativ aerobe Bakterien an einer Absenkung des Redoxpotentials im Wirbelschichtreaktor beteiligt, indem sie zugeführtes Acetat und Methanol oxidieren. Im Gegensatz zu SJA-Sequenzen, die der β - und γ -Unterklasse der Proteobacteria zugeordnet sind, gruppierten Sequenzen der δ -Unterklasse und der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt mit den 16S-rRNA-Sequenzen strikt anaerober Bakterien (z.B. *Syntrophus* spp., *Syntrophobacter* spp., *Geobacter* spp., *Clostridium* spp., *Dehalobacter* spp.). Von besonderem Interesse erscheint die enge Verwandtschaft der Klonfamilie SJA-19 mit den bisher beschriebenen Vertretern der Gattung *Dehalobacter*. Sowohl *D. restrictus* Stamm PER-K23 als auch das Isolat TEA wachsen durch die reduktive Dechlorierung von Tetra- oder Trichlorethen (Holliger et al., 1993 und 1998; Wild et al., 1996). Die Fähigkeit zum anaeroben Wachstum durch Dechlorierung chlororganischer Verbindungen ist auf die Vertreter bestimmter Gattungen wie etwa *Desulfomonile*, *Desulfitobacterium*, *Dehalobacterium* und *Dehalobacter* beschränkt. Es ist somit denkbar, daß die durch die Klonfamilie SJA-19 repräsentierten Bakterien an der anaeroben Dechlorierung von TCB beteiligt sind.

Neben dem Nachweis von SJA-Klonsequenzen, die mehr oder weniger nah mit bereits bekannten bakteriellen Genera verwandt sind, gruppierten etwa 50% der untersuchten SJA-Sequenzen mit 16S-rRNA-Genen bisher nicht kultivierter Bakterien. Mehr als ein Zehntel der SJA-Sequenzen wurde dem *Holophaga/Acidobacterium* Phylum zugeordnet. Diese erst kürzlich beschriebene phylogenetische Gruppe besteht zum überwiegenden Teil aus offenbar ubiquitär verbreiteten unkultivierten Umweltbakterien, die in unterschiedlichen Böden,

Süßwassersedimenten oder Torf gefunden wurden (Ludwig et al., 1997; Kuske et al., 1997; Rheims et al., 1996). Ein derart weitgestreutes Vorkommen läßt vermuten, daß die Vertreter des *Holophaga/Acidobacterium* Phylums ein breites physiologisches Spektrum besitzen. Besonders interessant ist die enge phylogenetische Verwandtschaft zwischen zahlreichen SJA-Sequenzen und unkultivierten Bakterien eines kontaminierten, anaeroben Grundwassers, in dem eine in-situ Biodegradation chlorierter und nichtchlorierter Kohlenwasserstoffe beobachtet wurde (Wurtsmith-Standort; Dojka et al., 1998). Das Auftreten nah verwandter Bakterien in anaeroben, dechlorierenden Konsortien reflektiert möglicherweise ähnliche physiologische Prozesse, bei der Dechlorierung chlororganischer Verbindungen.

Inwieweit die beobachtete hohe Diversität bakterieller 16S-rDNA-Sequenzen ein generelles Merkmal anaerober, TCB-dechlorierender Konsortien ist, muß weitgehend unbeantwortet bleiben, da vergleichbare Untersuchungen nicht publiziert sind. Unabhängige Studien an Bioreaktoren, in denen aromatische Verbindungen abgebaut werden, zeigen jedoch einen direkten Zusammenhang zwischen bakterieller Diversität und der Konstruktion des Reaktors (Stoffels et al., 1998). Wurde der Aromatenabbau in Fermentatoren durchgeführt, in denen das Zellwachstum in der flüssigen Phase erfolgte, zeigte sich eine sehr begrenzte Diversität verglichen mit dem Abbau in einem Tropfkörperbioreaktor mit immobilisierter Biomasse. Auch in Wirbelschichtreaktoren liegen die Mikroorganismen immobilisiert als Biofilm vor, was vermuten läßt, daß beide Reaktortypen die Ausbildung komplexer Bakteriengemeinschaften, die durch gute Immobilisierbarkeit und Langzeitstabilität gekennzeichnet sind, begünstigen. Die Beobachtung einer hohen bakteriellen Diversität in dem 1,2-Dichlorpropan-dechlorierenden Konsortium eines anaeroben Wirbelschichtreaktors unterstützt diese Vermutung (C. Schlötelburg, mündliche Mitteilung).

Im Gegensatz zur Komplexität der bakteriellen rDNA-Genbibliotheken waren die Euryarchaeota-spezifischen rDNA-Genbibliotheken klar von einer *M. concilii*-ähnlichen Klonfamilie dominiert (88.8% der SJC- bzw. 57.1% der SJD-Klone). Auch in der Wurtsmith-Untersuchung (Dojka et al., 1998), in der eine Archaea-spezifische rDNA-Genbibliothek untersucht wurde, dominierten *M. concilii*-ähnliche Klonsequenzen (81% aller untersuchten Klone). Die einzige bisher bekannte Form der Energiegewinnung innerhalb der Gattung *Methanosaeta* ist die aceticlastische Methanogenese (Whitman et al., 1992), was auf einen ebenfalls aceticlastischen

Phänotyp der bisher unkultivierten *M. concilii*-ähnlichen Archaea schließen läßt. Das niedrige Redoxpotential von -300 mV im Wirbelschichtreaktor und die kontinuierliche Zuführung von Acetat unterstützen diese Vermutung. Die charakterisierten, nicht *M. concilii*-ähnlichen Euryarchaeota-Klonsequenzen des TCB-transformierenden Konsortiums repräsentierten mit einer Ausnahme unkultivierte *Methanosarcina*- und *Methanobacterium*-ähnliche Archaea. Ebenso wie Vertreter der Gattung *Methanosaeta* gewinnen *Methanosarcina* spp. Energie aus einer acetoclastischen Methanogenese (Whitman et al., 1992). Zusätzlich können eine Reihe kultivierter Vertreter der Gattungen *Methanosarcina* und *Methanobacterium* bei Mangel an gebundenem Stickstoff diazotroph wachsen (Lobo und Zinder, 1992), was die Fähigkeit zur Fixierung molekularen Stickstoffs auch für die unkultivierten Vertreter vermuten läßt. Das Vorkommen methanogener Archaea ist für eine Reihe anaerober, TCB-dechlorierender Konsortien beschrieben (Holliger et al., 1992; Ramanand et al., 1993; Nowak et al., 1996; Middeldorp et al., 1997; Adrian et al., 1998). Im Wirbelschichtreaktor spielen diese Organismen wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Bildung und Aufrechterhaltung des auf den Polyurethanschaumkörpern immobilisierten Biofilms, wie dies bereits für anaerobe Bioreaktoren abweichender Bauart gezeigt wurde (Veiga et al., 1997).

2 Ergänzende Untersuchungen zum Metabolismus einzelner Mikroorganismen des TCB-dechlorierenden Konsortiums

Die kulturunabhängige, vergleichende 16S-rDNA-Sequenzanalyse erlaubt die phylogenetische Einordnung bisher unkultivierter Bakterien und Archaea. Da die 16S-rDNA-Phylogenie keine direkten Aussagen über die phänotypischen Eigenschaften des jeweiligen Mikroorganismus erlaubt, muß der rRNA-Ansatz durch die Charakterisierung spezifischer, funktioneller Gene und/oder eine in-vitro Kultivierung ergänzt werden, um genauere Aussagen über die Funktion der Mikroorganismen in ihrem jeweiligen Habitat treffen zu können. Bisher sind zwei Fälle beschrieben, in denen die phylogenetische Klassifizierung eine gezielte in-vitro Kultivierung von bisher unkultivierten Mikroorganismen gestattete. Kane et al. (1993) konnten ein sulfatreduzierendes Bakterium, dessen 16S-rDNA-Sequenz zuvor in einer rDNA-Genbibliothek nachgewiesen worden war, aus einem anaeroben Laborreaktor anreichern und isolieren. Dabei entsprach die Zusammensetzung des Kultivierungsmediums den physiologischen Eigenschaften des phylogenetisch

nächsten kultivierbaren Verwandten. Mit einem abweichenden methodischen Ansatz isolierten Huber et al. (1995) ein hyperthermophiles Archaeon aus Wasser- und Sedimentproben einer heißen Quelle. Nach kulturunabhängiger, vergleichender 16S-rDNA-Sequenzanalyse wurde eine klonspezifische Oligonukleotidsonde entwickelt, die eine Bestimmung der Zellmorphologie des entsprechenden Organismus mittels FISH ermöglichte. So konnten typisch geformte Zellen mit Hilfe einer lasergestützten Zellseparierungseinheit („Optical Tweezer“) aus Anreicherungskulturen abgetrennt und kultiviert werden. Wenngleich der zweite Ansatz eine elegante Alternative zur traditionellen Gewinnung von Reinkulturen darstellt, ist er doch wesentlich durch die Zellmorphologie von Bakterien und Archaea limitiert, die nur in wenigen Fällen eine eindeutige Identifizierung zulässt. Demgegenüber erlaubt der ständig wachsende 16S-rRNA-Sequenzdatensatz bereits kultivierter Bakterien und Archaea eine immer genauere phylogenetische Zuordnung auch unkultivierter Mikroorganismen und ermöglicht somit immer genauere Hypothesen zur Physiologie dieser Organismen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht die hypothetischen Aussagen zur Physiologie einiger unkultivierter Bakterien und Archaea des TCB-dechlorierenden Konsortiums durch gezielte kulturelle Anreicherung und Isolierung bzw. den kulturunabhängigen Nachweis spezifischer, funktioneller Gene zu bestätigen.

2.1 Isolierung fakultativ aerober sowie nitratreduzierender Bakterien

Die vergleichende 16S-rDNA-Sequenzanalyse ergab Hinweise auf die Anwesenheit einer Reihe bisher unkultivierter, aerober bzw. fakultativ aerober, nitratreduzierender Bakterien der Gattungen *Pseudomonas*, *Zoogloea*, *Thauera* und *Variovorax* im TCB-dechlorierenden Konsortium. Unter den Kultivierungsbedingungen im Bioreaktor gewinnen diese Organismen wahrscheinlich Energie aus der aeroben Oxidation des zugeführten Acetats und/oder Methanols und tragen somit zu einer Absenkung des Redoxpotentials bei. Obwohl im Bioreaktor keine erkennbare Umsetzung von Benzol erfolgt, ist dennoch eine Oxidation durch aerobe Bakterien denkbar. Für eine selektive Vermehrung fakultativ aerober Organismen wurden daher Anreicherungskulturen angesetzt, in denen Acetat und Benzoat, aufgrund der gegenüber Benzol besseren Wasserlöslichkeit und geringeren Toxizität, als Kohlenstoff- und Energiequelle dienten. Aus diesen Anreicherungskulturen gelang es, Bakterien zu isolieren, die nach der vergleichenden 16S-rDNA-Sequenzanalyse alle der Gattung *Pseudomonas* zugeordnet werden konnten. Ein Vergleich mit den

SJA-Klonsequenzen zeigte lediglich eine Base Unterschied zwischen der 16S-rDNA-Sequenz des Isolats OLB-1 und der Klonsequenz SJA-64.

Zur Isolierung nitratreduzierender Bakterien, wurden anaerobe Anreicherungskulturen mit Nitrat und Acetat als einzigem verfügbarem Elektronenakzeptor bzw. Kohlenstoffquelle angesetzt. Analog zur aeroben Anreicherung konnten auch aus diesen Kulturen nur *Pseudomonas*-ähnliche Bakterien isoliert werden, die jedoch mit keiner der *Pseudomonas*-ähnlichen SJA-Sequenzen identisch waren. Wenn auch die Isolierung eines breiteren Spektrums von Organismen mit den gewählten Anreicherungsbedingungen nicht möglich war, so zeigt doch die Übereinstimmung zwischen Isolat OLB-1 und Klon SJA-64, daß die in-vitro Kultivierung eines bisher unkultivierten Bakteriums (SJA-64) erfolgreich war. Dieses Ergebnis belegt, daß die PCR-vermittelte 16S-rDNA Analyse unkultivierter Bakterien bei ausreichend hohen Sequenzhomologien (>99%) geeignet ist, Aussagen über den Energiemetabolismus noch unkultivierter Bakterien zu gestatten.

2.2 Isolierung selenatreduzierender Bakterien

Im TCB-transformierenden Konsortium konnten nach kulturunabhängiger, phylogenetischer Analyse unkultivierte, *Thauera*-ähnliche Bakterien nachgewiesen werden. Die zwei bisher beschriebenen Spezies dieser Gattung sind fakultativ anaerobe, denitrifizierende Bakterien. *Thauera aromatica* nutzt unter denitrifizierenden Bedingungen aromatische Verbindungen als Kohlenstoff- und Energiequelle (Anders et al., 1995; Song et al., 1998), wohingegen *T. selenatis* fakultativ durch Selenat-Respiration, d.h. die respiratorische Reduktion von Selenat zu elementarem Selen, wachsen kann (Macy et al., 1989 und 1993). Wenngleich die Fähigkeit von Mikroorganismen unter anaeroben Bedingungen Selenat und Selenit zu elementarem Selen zu reduzieren bereits mehrfach beschrieben ist (Oremland et al., 1989; Steinberg und Oremland, 1990; Steinberg et al., 1992), so sind doch mit „*Geospirillum barnesii*“, Stamm SES-3 (Oremland et al., 1994), *Enterobacter cloacae*, Stamm SLD1a-1 (Losi und Frankenberger, 1997), *Bacillus* sp., Stamm SF-1 (Fujita et al., 1997) und *B. arsenicoselenatis* (Blum et al., 1998) nur vier weitere bakterielle Reinkulturen bekannt, die eine Selenat-Respiration durchführen können. Die Begrenzung des selenatrespirierenden Phänotyps auf einige Organismen ließen eine engere Korrelation zwischen 16S-rRNA-Phylogenie und Physiologie vermuten. Daher wurde für die im TCB-dechlorierenden Konsortium auftretenden, unkultivierten

Thauera-Vertreter ein *T. selenatis*-ähnlicher Energiemetabolismus angenommen, der eine selektive Anreicherung unter selenatrespirierenden Bedingungen aussichtsreich erscheinen ließ. Mit Hilfe des für *T. selenatis* beschriebenen Kultivierungsmediums (Macy et al., 1989) konnten mehrere Isolate gewonnen werden, die unter anaeroben Bedingungen elementares Selen bildeten. Die damit verbundene Reduktion von Selenat kann entweder, wie für *Wolinella succinogenes* und *Desulfovibrio desulfuricans* beschrieben, kometabolisch oder als Selenatrespiration erfolgen (Macy et al., 1989; Tomei et al., 1992 und 1995). Drei Beobachtungen sprechen für eine respiratorische Selenatreduktion durch die isolierten Reinkulturen. (i) Die Bildung elementaren Selens erfolgte auch in Kulturen, denen lediglich Acetat und Methanol bzw. Selenat als potentielle Kohlenstoff- und Energiequelle bzw. Elektronenakzeptor zugefügt waren. (ii) Wie bei Isolat Se-34 nachgewiesen, korreliert die Menge an gebildetem Selen mit dem Zellwachstum. (iii) Die Bildung von elementarem Selen erfolgte bei Selenatkonzentrationen zwischen 20 und 40 mM. Eine kometabolische, anaerobe Selenatreduktion wird jedoch nur bis zu einer Selenatkonzentration von maximal 10 mM beobachtet (Tomei et al., 1992 und 1995). Ein Vergleich der 16S-rDNA-Sequenzen von 14 der 25 Isolate ergab weder eine nähere phylogenetische Verwandtschaft zu den bekannten selenatrespirierenden Bakterien noch zu den beschriebenen SJA-Klonsequenzen. Die hohe phylogenetische Diversität der Isolate zeigt vielmehr, daß die gewählten Anreicherungsbedingungen nicht selektiv für eine bestimmte phylogenetische Gruppe waren. Dies läßt vermuten, daß die Fähigkeit zur anaeroben Selenatrespiration innerhalb der Bacteria wesentlich weiter verbreitet ist, als man dies aus der geringen Anzahl der Isolate bisher vermuten konnte. Dieses Beispiel verdeutlicht, daß eine auf der 16S-rRNA-Phylogenie eines unkultivierten Mikroorganismus basierende Kultivierungsstrategie nur dann erfolgreich sein kann, wenn es gelingt, aus den physiologischen Eigenschaften der kultivierbaren Verwandten selektive Wachstumsbedingungen abzuleiten. Es zeigt weiterhin, daß molekulargenetische Analysen mikrobieller Diversität stets von Kultivierungsbemühungen begleitet sein sollten, um Aussagen zur Funktion der jeweiligen Mikroorganismen treffen zu können.

2.3 Molekulargenetischer Nachweis stickstofffixierender Mikroorganismen

Wie bereits am Beispiel der selenatreduzierenden Bakterien ausgeführt (s. IV.2.2), kann die in-vitro Kultivierung eines nur phylogenetisch charakterisierten Mikroorganismus durch eine geringe Korrelation zwischen 16S-rRNA-Phylogenie und Physiologie erschwert sein. Versuche zur selektiven Anreicherung und Isolierung sind jedoch auch limitiert, wenn der unkultivierte Mikroorganismus phylogenetisch einer Gruppe schwer kultivierbarer Bakterien oder Archaea zugeordnet wurde. So zeigen beispielsweise nahezu alle nitrifizierenden oder methanotrophen Bakterien und viele Vertreter der methanogenen Archaea aufgrund langer Generationszeiten und komplexer Nährstoffansprüche in Laborkulturen ein geringes Zellwachstum. Diese Organismen besitzen einen spezialisierten Metabolismus der durch die direkte Identifizierung der funktionellen Gene kulturunabhängig nachgewiesen werden kann. Holmes et al. (1995) nutzten diesen Ansatz durch Nachweis des für die große Untereinheit der Methanol-Dehydrogenase kodierenden Gens, um die 16S-rDNA-basierende Analyse methanotropher Bakterien zu ergänzen. In einer vergleichbaren Arbeit wurde das Strukturgen *amoA* der Ammonium-Monooxygenase zur Überprüfung der kulturunabhängigen Analyse ammoniumoxidierender Bakterien in Belebtschlamm verwendet (Juretschko et al., 1998). Im TCB-dechlorierenden Konsortium konnten die 16S-rDNA-Sequenzen methanogener, *Methanosarcina*-ähnlicher Archaea nachgewiesen werden. Da eine Reihe von *Methanosarcina* spp. diazotroph wachsen können (Lobo und Zinder, 1992), ist ein stickstofffixierender Phänotyp der unkultivierten Vertreter denkbar. Eines der Schlüsselenzyme der Stickstofffixierung, die Dinitrogenase-Reduktase (NifH-Protein), bietet sich zur Ergänzung 16S-rDNA-basierender Untersuchungen an, da die NifH-Phylogenie im wesentlichen mit der der 16S-rDNA übereinstimmt (Hennecke et al., 1985; Ueda et al., 1995). So konnten im TCB-dechlorierenden Konsortium NifH-Proteinsequenzen nachgewiesen werden, die sowohl mit der typischen, molybdenhaltigen (NifH2) als auch der alternativen Dinitrogenase-Reduktase (NifH1) nahezu identisch waren und die funktionell wichtigen Aminosäuren enthielten. Dies ist als sicherer Hinweis auf die Anwesenheit bisher unkultivierter, diazotropher *Methanosarcina* spp. zu werten und bestätigt somit die aus der 16S-rDNA-Phylogenie abgeleitete Vermutung zum Metabolismus dieser Organismen. Der molekulargenetische Nachweis des diazotrophen Phänotyps erleichtert möglicherweise eine Isolierung dieser Organismen, da die Verwendung eines *Methanosarcina*-Kultivierungsmediums, das

keinen gebundenen Stickstoff enthält, eine sehr selektive Anreicherung gewährleisten sollte.

Die Analyse der übrigen NifH-Proteinsequenzen des TCB-transformierenden Konsortiums zeigte eine unerwartet hohe Diversität stickstofffixierender methanogener Archaea. Wenngleich die nahezu identischen Sequenzen SN-8, SN-10 und SN-42 möglicherweise von einem Organismus stammen und unterschiedliche Genkopien repräsentieren, wie dies für *Paenibacillus azotofixans* beschrieben ist (Rosado et al., 1998), so läßt sich doch vermuten, daß die Euryarchaeota-Diversität nicht durch die untersuchten rDNA-Sequenzen der Euryarchaeota-spezifischen rDNA-Genbibliotheken allein bestimmt werden kann.

3 Einfluß der Kultivierungsbedingungen auf die Dechlorierungsleistung und Populationszusammensetzung des TCB-dechlorierenden Konsortiums

Die Analyse undefinierter mikrobieller Konsortien ist zwar geeignet die ökologischen Faktoren zu bestimmen, die eine anaerobe TCB-Dechlorierung beeinflussen, sie gibt jedoch wenig Auskunft über den biochemischen Mechanismus dieses Prozesses. Dennoch läßt sich aufgrund unabhängiger Untersuchungen vermuten, daß die schrittweise anaerobe Dechlorierung von TCB zu DCB, MCB und Benzol durch reduktive Dehalogenierung in einem anaeroben respiratorischen Prozess erfolgt (zur Übersicht s. Holliger und Schraa, 1994; Wohlfarth und Diekert, 1997). In diesem Fall dienen die chlorierten Benzole als terminale Elektronenakzeptoren und die Gegenwart alternativer Elektronenakzeptoren wie Sulfat oder Nitrat kann die Dechlorierungsleistung verringern (zur Übersicht s. Mohn und Tiedje, 1992). Bei der anaeroben, mikrobiellen Dechlorierung TCB-belasteter Wässer (z.B. Grund- oder Prozesswasser) können diese Aspekte von wesentlicher Relevanz sein, da mit einer Reihe potentieller Elektronenakzeptoren zu rechnen ist. Aus diesem Grund wurde der Einfluß von Nitrat auf die TCB-Dechlorierung im anaeroben Wirbelschichtreaktor untersucht. Es zeigte sich, daß die Zudosierung von Nitrat mit einem starken Anstieg des Redoxpotentials und einem Abfall der Dechlorierungsleistung verbunden war und dieser Effekt teilweise umkehrbar war, wenn dem Reaktor erneut Mineralsalzmedium ohne Nitrat zugeführt wurde. Ansätze zur Quantifizierung des TCB-dechlorierenden Konsortiums in diesen Kultivierungsphasen konnten nicht befriedigen. Eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit klonspezifischen

Oligonukleotidsonden („full-cycle-rRNA-analysis“; Amann et al., 1995; Snaidr et al., 1997; Schuppler et al., 1998) erlaubte zwar den Nachweis von Bakterien der Klonfamilien SJA-186 und SJA-118 im Bioreaktor vor der Zuführung von Nitrat, jedoch verhinderten die mit der Immobilisierung des TCB-transformierenden Konsortiums verbundenen Probleme, wie Zellaggregation und Autofluoreszenz, eine quantitative Analyse. Auch die Untersuchung von rDNA-Genbibliotheken, die den Zustand des Konsortiums jeweils vor und nach der Zudosierung von Nitrat repräsentierten, ergab keine Aufschlüsse über etwaige Verschiebungen innerhalb der Population, da drei der fünf gewählten SJA-Klonfamilien in keiner der Genbibliotheken E, F, G und H wiedergefunden werden konnten.

Der Nachweis von Vertretern der Klonfamilien SJA-19 und SJH-171 im TCB-transformierenden Konsortium etwa zwei Jahre nach der ersten Probennahme und die Regenerationsfähigkeit der Mischkultur nach erneuter Zudosierung von Mineralsalzmedium ohne Nitrat lassen jedoch vermuten, daß die Zusammensetzung des Konsortiums durch die Zuführung von Nitrat nicht nachhaltig gestört wurde und es nicht zu einer signifikanten Austragung wichtiger Mitglieder der Population aus dem Wirbelschichtreaktor kam.

4 Ausblick

In der vorliegenden Untersuchung eines anaeroben, aus Saalesediment angereicherten, TCB-dechlorierenden Konsortiums wurde durch kulturunabhängige und kulturabhängige Methoden eine hohe bakterielle Diversität nachgewiesen. Da vergleichbare Untersuchungen anaerober, TCB-dechlorierenden Konsortien bisher nicht publiziert sind, muß die Frage, inwieweit es sich dabei um ein generelles Merkmal solcher Populationen handelt, unbeantwortet bleiben. Die vielfältigen hypothetischen und nachgewiesenen energiemetabolischen Fähigkeiten der Bakterien erklären die Fähigkeit des untersuchten TCB-dechlorierenden Konsortiums kurzfristige Störungen, wie etwa ein Ansteigen des Redoxpotentials im Wirbelschichtreaktor, auszugleichen. Diese begrenzte Selbstregulation ist besonders bei einer Behandlung komplexer Abwässer von Vorteil. Der Nachweis bisher unkultivierter *Dehalobacter* spp. mit einem vermuteten dechlorierenden Phänotyp und die auffällige Übereinstimmung mit der in einem Chlororganika-kontaminierten, anaeroben Grundwasser (Wurtsmith-Standort; Dojka et al., 1998) beobachteten mikrobiellen Diversität zeigen die spezifische Struktur des TCB-dechlorierenden

Konsortiums und geben Hinweise auf mögliche Indikatororganismen, die in weiteren reduktiv dechlorierenden Konsortien auftreten. So konnten kürzlich sowohl *Dehalobacter*-ähnliche als auch mit SJA- und Wurtsmith-Klonen verwandte rDNA-Sequenzen aus 1,2-Dichlorpropan-dechlorierenden, anaeroben Konsortien isoliert werden (C. Schlötelburg, mündliche Mitteilung). Die 16S-rDNA-basierende Analyse einer größeren Zahl reduktiv dechlorierender Konsortien wird genauere Aussagen über das Vorhandensein einer spezifischen Populationsstruktur erlauben. Ein quantitativer Nachweis von Indikatororganismen gestattet eine Korrelation der Zellzahl mit der Dechlorierungsaktivität und erlaubt somit ein Monitoring komplexer Mischkulturen, deren Verwendung besonders bei der Dechlorierung industrieller Abwässer aussichtsreich ist (Flora et al., 1994; Boucquey et al., 1995). Methodisch würden sich hierzu im Wirbelschichtreaktor aufgrund der geschilderten Probleme bei der FISH eine quantitative Hybridisierung direkt extrahierter rRNA oder eine quantitative RT-PCR anbieten (Stahl et al., 1988; Felske et al., 1998).

V LITERATURVERZEICHNIS

Adrian, L., Manz, W., Szewzyk, U., & Görisch, H. (1998). Physiological characterization of a bacterial consortium reductively dechlorinating 1,2,3- and 1,2,4-trichlorobenzene. *Appl Environ Microbiol* **64**, 496-503.

Akkermans, A. D. L., Mirza, M. S., Harmsen, H. J. M., Blok, H. J., Herron, P. R., Sessitsch, A., & Akkermans, W. M. (1994). Molecular ecology of microbes: a review of promises, pitfalls and true progress. *FEMS Microbiol Rev* **15**, 185-194.

Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., & Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1919-1925.

Amann, R. I., Krumholz, L., & Stahl, D. A. (1990a). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* **172**, 762-770.

Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**, 143-169.

Anders, H.-J., Kaetzke, A., Kämpfer, P., Ludwig, W., & Fuchs, G. (1995). Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying Pseudomonad strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of *Proteobacteria*. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 327-333.

Aslanidis, C. & de Jong, P. J. (1990). Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucl Acids Res* **18**, 6069-6074.

Aslanidis, C., de Jong, P. J., & Schmitz, G. (1994). Minimal length requirement of the single-stranded tails for ligation-independent cloning (LIC) of PCR products. *PCR Meth Applic* **4**, 172-177.

Barns, S. M., Fundyga, R. E., Jeffries, M. W., & Pace, N. R. (1994). Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 1609-1613.

Beil, S., Happe, B., Timmis, K. N., & Pieper, D. M. (1997). Genetic and biochemical characterization of the broad spectrum chlorobenzene dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain PS12: dechlorination of 1,2,4,5-tetrachlorobenzene. *Eur J Biochem* **247**, 190-199.

Beyer, W. N. (1996). Accumulation of chlorinated benzenes in earthworms. *Bull Environ Contam Toxicol* **57**, 729-736.

Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* **7**, 1513-1523.

Blum, J. S., Bindi, A. B., Buzzelli, J., Stolz, J. F., & Oremland, R. S. (1998). *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. *Arch Microbiol* **171**, 19-30.

Bomhard, E., Luckhaus, G., Voigt, W. H., & Loeser, E. (1988). Induction of light hydrocarbon nephropathy by p-dichlorobenzene. *Arch Toxicol* **61**, 433-439.

Borneman, J., Skroch, P. W., O'Sullivan, K. M., Palus, J. A., Rumjanek, N. G., Jansen, J. L., Nienhuis, J., & Triplett, E. W. (1996). Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1935-1943.

Borneman, J. & Triplett, E. W. (1997). Molecular diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2647-2653.

Bosma, T. N. P., Van der Meer, J. R., Schraa, G., Tros, M. E., & Zehnder, A. J. B. (1988). Reductive dechlorination of all trichloro- and dichlorobenzene isomers. *FEMS Microbiol Ecol* **53**, 223-229.

Bouchard, B., Beaudet, R., Villemur, R., McSween, G., Lépine, F., & Bisaillon, J.-G. (1996). Isolation and characterization of *Desulfitobacterium frappieri* sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 1010-1015.

Boucquey, J.-B., Renard, P., Amerlynck, P., Modesto Filho, P., Agathos, S. N., Naveau, H., & Nyns, E.-J. (1995). High-rate continuous biodegradation of concentrated chlorinated aliphatics by a durable enrichment of methanogenic origin under carrier-dependent conditions. *Biotechnol Bioeng* **47**, 298-307.

Boyle, J. S. & Lew, A. M. (1995). An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *TIG* **11**, 8

Bradford, D., Hugenholtz, P., Seviour, E. M., Cunningham, M. A., Stratton, H., Seviour, R. J., & Blackall, L. L. (1996). 16S rRNA analysis of isolates obtained from Gram-negative, filamentous bacteria micromanipulated from activated sludge. *System Appl Microbiol* **19**, 334-343.

Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D., & Noller, H. F. (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **148**, 107-127.

Bull, A. T., Goodfellow, M., & Slater, J. H. (1992). Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annu Rev Microbiol* **46**, 219-252.

Canonero, R., Campart, G. B., Mattioli, F., Robbiano, L., & Martelli, A. (1997). Testing of p-chlorobenzene and hexachlorobenzene for their ability to induce DNA

damage and micronucleus formation in primary cultures of rat and human. *Mutagenesis* **12**, 35-39.

Cary, S. C., Cottrell, M. T., Stein, J. L., Camacho, F., & Desbruyères, D. (1997). Molecular identification and localization of filamentous symbiotic bacteria associated with the hydrothermal vent annelid *Alvinella pompejana*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 1124-1130.

Chaisuksant, Y., Yu, Q., & Connell, D. W. (1998). Effects of halobenzenes on growth rate of fish (*Gambusia affinis*). *Ecotoxicol Environ Saf* **39**, 120-130.

Chandler, D. P., Frederickson, J. K., & Brockman, F. J. (1997). Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Mol Ecol* **6**, 475-482.

Chien, Y. T. & Zinder, S. H. (1994). Cloning, DNA sequencing, and characterization of a *nifD*-homologous gene from the archaeon *Methanosarcina barkeri* 227 which resembles *nifD1* from the eubacterium *Clostridium pasteurianum*. *J Bacteriol* **176**, 6590-6598.

Choi, B. K., Paster, B. J., Dewhirst, F. E., & Göbel, U. B. (1994). Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis. *Infect Immun* **62**, 1889-1895.

Christiansen, N. & Ahring, B. K. (1996). *Desulfitobacterium hafniense* sp. nov., an anaerobic, reductively dechlorinating bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 442-448.

Christiansen, N., Hendriksen, H. V., Järvinen, K. T., & Ahring, B. K. (1995). Degradation of chlorinated aromatic compounds in UASB reactors. *Wat Sci Tech* **31**, 249-259.

Cole, J. R., Cascarelli, A. L., Mohn, W. W., & Tiedje, J. M. (1994). Isolation and characterization of a novel bacterium growing via reductive dehalogenation of 2-chlorophenol. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3536-3542.

Dean, D. R. & Jacobson, M. R. (1992). Biochemical genetics of nitrogenase. In *Biological nitrogen fixation*. Stacey G., Evans H. J., Burris R. H. (eds.). London: Chapman and Hall, 763-834.

DeLong, E. F., Wickham, G. S., & Pace, N. R. (1989). Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**, 1360-1362.

DeWeerd, K. A., Mandelco, L., Tanner, R. S., Woese, C. R., & Suflita, J. M. (1990). *Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium. *Arch Microbiol* **154**, 23-30.

Dojka, M. A., Hugenholtz, P., Haack, S. K., & Pace, N. R. (1998). Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3869-3877.

El Fantroussi, S., Naveau, H., & Agathos, S. N. (1998). Anaerobic dechlorinating bacteria. *Biotechnol Prog* **14**, 167-188.

Engelen, B., Meinken, K., von Wintzingerode, F., Heuer, H., Malkomes, H.-P., & Backhaus, H. (1998). Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2814-2821.

Farrelly, V., Rainey, F. A., & Stackebrandt, E. (1995). Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl Environ Microbiol* **61**, 2798-2801.

Fenchel, T., Perry, T., & Thane, A. (1977). Anaerobiosis and symbiosis with bacteria in free-living ciliates. *J Protozool* **24**, 154-163.

Felsenstein, J. (1978). Cases in which parsimony and compatibility methods will be positively misleading. *Syst Zool* **27**, 401-410.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.

Felske, A., Akkermans, A. D. L., & De Vos, W. M. (1998). Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Appl Env Microbiol* **64**, 4581-4587.

Fetzner, S. & Lingens, F. (1994). Bacterial dehalogenases: Biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiol Rev* **58**, 641-685.

Flora, J. R. V., Suidan, M. T., Wuellner, A. M., & Boyer, T. K. (1994). Anaerobic treatment of a simulated high-strength industrial wastewater containing chlorophenols. *Wat Environ Res* **66**, 21-31.

Fujita, M., Ike, M., Nishimoto, S., Takahashi, K., & Kashiwa, M. (1997). Isolation and characterization of a novel selenate-reducing bacterium, *Bacillus* sp. SF-1. *J Ferm Bioengineering* **83**, 517-522.

Gelfand, D. H. (1992). *Taq* DNA Polymerase. In PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. Ehrlich H. A. (ed). New York: Freeman and Company, 17-22.

Gerritse, J., Renard, V., Gomes, T. M. P., Lawson, P. A., Collins, M. D., & Gottschal, J. C. (1996). *Desulfitobacterium* sp. strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or *ortho*-chlorinated phenols. *Arch Microbiol* **165**, 132-140.

Giovannoni, S. J., Britschgi, T. B., Moyer, C. L., & Field, K. G. (1990). Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature (London)* **345**, 60-63.

Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., & Moletta, R. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2802-2813.

Göbel, U. B. (1995). Phylogenetic amplification for the detection of uncultured bacteria and the analysis of complex microbiota. *J Microbiol Meth* **23**, 117-128.

Gustafson, D. L., Coulson, A. L., Feng, L., Pott, W. A., Thomas, R. S., Chubb, L. S., Saghir, S. A., Benjamin, S. A., & Yang, R. S. (1998). Use of a medium-term liver focus bioassay to assess the hepatocarcinogenicity of 1,2,4,5-tetrachlorobenzene. *Cancer Lett* **129**, 39-44.

Gutell, R. R., Larsen, N., & Woese, C. R. (1994). Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol Rev* **58**, 10-26.

Hansen, M. C., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., & Molin, S. (1998). Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiol Ecol* **26**, 141-149.

Häggblom, M. M., Rivera, M. D., & Young, L. Y. (1996). Anaerobic degradation of halogenated benzoic acids coupled to denitrification observed in a variety of sediment and soil samples. *FEMS Microbiol Letters* **144**, 213-219.

Hennecke, H., Kaluza, K., Thöny, B., Fuhrmann, M., Ludwig, W., & Stackebrandt, E. (1985). Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S rRNA in *Rhizobium* species and other nitrogen fixing bacteria. *Arch Microbiol* **142**, 342-348.

Hermanson, M. H., Monosmith, C. L., & Donnellykelleher, M. T. (1997). Seasonal and spatial trends of certain chlorobenzene isomers in the Michigan atmosphere. *Atmospheric Environ* **31**, 567-573.

Hill, R. H. J., Ashley, D. L., Head, S. L., Needham, L. L., & Pirkle, J. L. (1995). Para-dichlorobenzene exposure among 1,000 adults in the United States. *Arch Environ Health* **50**, 277-280.

Holliger, C., Schraa, G., Stams, A. J. M., & Zehnder, A. J. B. (1992). Enrichment and properties of an anaerobic mixed culture reductively dechlorinating 1,2,3-trichlorobenzene to 1,3-dichlorobenzene. *Appl Environ Microbiol* **58**, 1636-1644.

Holliger, C., Schraa, G., Stams, A. J. M., & Zehnder, A. J. B. (1993). A highly purified enrichment culture couples the reductive dechlorination of tetrachloroethene to growth. *Appl Environ Microbiol* **59**, 2991-2997.

Holliger, C. & Schraa, G. (1994). Physiological meaning and potential for application of reductive dechlorination by anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **15**, 297-305.

- Holliger, C., Hahn, D., Harmsen, H., Ludwig, W., Schuhmacher, W., Tindall, B., Vazquez, F., Weiss, N., & Zehnder, A. J. B. (1998). *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration. *Arch Microbiol* **169**, 313-321.
- Holmes, A. J., Owens, N. J. P., & Murrell, J. C. (1995). Detection of novel marine methanotrophs using phylogenetic and functional gene probes after methane enrichment. *Microbiology* **141**, 1947-1955.
- Huber, R., Burggraf, S., Mayer, T., Barns, S. M., Rossnagel, P., & Stetter, K. O. (1995). Isolation of a hyperthermophilic archaeum predicted by *in situ* RNA analysis. *Nature (London)* **376**, 57-58.
- Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K. L., & Pace, N. R. (1998). Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol* **180**, 366-376.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M., & Pace, N. R. (1998a). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* **180**, 4765-4774.
- Janssen, D. B., Pries, F., & van der Ploeg, J. R. (1994). Genetics and biochemistry of dehalogenating enzymes. *Annu Rev Microbiol* **48**, 163-191.
- Jones, L. R., Owen, S. A., Horrell, P., & Burns, R. G. (1998). Bacterial inoculation of granular activated carbon filters for the removal of atrazine from surface water. *Wat Res* **32**, 2542-2549.
- Jukes, T. H. & Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In Munro, H.N. (ed). *Mammalian protein metabolism*. New York, N. Y.: Academic Press, 21-132.
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K. H., Pommerening-Röser, A., Koops, H.-P., & Wagner, M. (1998). Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3042-3051.
- Kalmbach, S., Manz, W., & Szewzyk, U. (1997). Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their *in situ* dominance with highly specific 16S rRNA probes. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4164-4170.
- Kane, M. D., Poulsen, L. K., & Stahl, D. A. (1993). Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* **59**, 682-686.
- Krumholz, L. R., Sharp, R., & Fishbain, S. S. (1996). A freshwater anaerobe coupling acetate oxidation to tetrachloroethylene dehalogenation. *Appl Environ Microbiol* **62**, 4108-4113.

Kuske, C. R., Barns, S. M., & Busch, J. D. (1997). Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3614-3621.

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In Stackebrandt E., Goodfellow M., (eds). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester, England: John Wiley and Sons Ltd. 6, 115-173.

Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 6955-6959.

Larsen, N., Olsen, G. J., Maidak, B. L., McCaughey, M. J., Overbeek, R., Macke, T. J., Marsh, T. L., & Woese, C. R. (1993). The ribosomal database project. *Nucl Acids Res* **21**, 3021-3023.

Liesack, W. & Stackebrandt, E. (1992). Occurrence of novel groups of the domain *Bacteria* as revealed by analysis of genetic material from an australian terrestrial environment. *J Bacteriol* **174**, 5072-5078.

Liesack, W., Weyland, H., & Stackebrandt, E. (1991). Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed culture of strict barophylic bacteria. *Microb Ecol* **21**, 191-198.

Lobo, A. L. & Zinder, S. H. (1992). Nitrogen fixation by methanogenic bacteria. In *Biological nitrogen fixation*. Stacey, G., Evans, H. J., Burris, R. H. (eds). London: Chapman and Hall, 191-211.

Losi, M. E. & Frankenberger Jr., W. T. (1997). Reduction of selenium oxyanions by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1: isolation and growth of the bacterium and its expulsion of selenium particles. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3079-3084.

Ludwig, W., Bauer, S. H., Bauer, M., Held, I., Kirchhof, G., Schulze, R., Huber, I., Spring, S., Hartmann, A., & Schleifer, K. H. (1997). Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiol Letters* **153**, 181-190.

Macy, J. M., Michel, T. A., & Kirsch, D. G. (1989). Selenate reduction by a *Pseudomonas* species: a new mode of anaerobic respiration. *FEMS Microbiol Letters* **61**, 195-198.

Macy, J. M., Rech, S., Auling, G., Dorsch, M., Stackebrandt, E., & Sly, L. I. (1993). *Thauera selenatis* gen. nov., sp. nov., a member of the beta subclass of *Proteobacteria* with a novel type of anaerobic respiration. *Int J Syst Bacteriol* **43**, 135-142.

Malle, K.-G. (1984). Die Bedeutung der 129 Stoffe der EG-Liste für den Gewässerschutz. *Zeitung Wasser-Abwasser-Forsch* **17**, 75-81.

Massol-Deyá, A., Weller, R., Ríos-Hernández, L., Zhou, J.-Z., Hickey, R. F., & Tiedje, J. M. (1997). Succession and convergence of biofilm communities in fixed-film reactors treating aromatic hydrocarbons in groundwater. *Appl Environ Microbiol* **63**, 270-276.

Maymó-Gatell, X., Chien, Y., Gossett, J. M., & Zinder, S. H. (1997). Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* **276**, 1568-1571.

Mägli, A., Wendt, M., & Leisinger, T. (1996). Isolation and characterization of *Dehalobacterium formicoaceticum* gen. nov. sp. nov., a strictly anaerobic bacterium utilizing dichloromethane as source of carbon and energy. *Arch Microbiol* **166**, 101-108.

McGrath, J. E. & Harfoot, C. G. (1997). Reductive dehalogenation of halocarboxylic acids by the phototrophic genera *Rhodospirillum* and *Rhodopseudomonas*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3333-3335.

Meyerhans, A., Vartanian, J.-P., & Wain-Hobson, S. (1990). DNA recombination during PCR. *Nucl Acids Res* **18**, 1687-1691.

Middeldorp, P. J. M., De Wolf, J., Zehnder, A. J. B., & Schraa, G. (1997). Enrichment and properties of a 1,2,4-trichlorobenzene-dechlorinating methanogenic microbial consortium. *Appl Environ Microbiol* **63**, 1225-1229.

Mohn, W. W. & Tiedje, J. M. (1992). Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol Rev* **56**, 482-507.

Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**, 695-700.

Nishino, S. F., Spain, J. C., Belcher, L. A., & Litchfield, C. D. (1992). Chlorobenzene degradation by bacteria isolated from contaminated groundwater. *Appl Environ Microbiol* **58**, 1719-1726.

Nowak, J. (1994). Umsatz von Chlorbenzolen durch methanogene Mischkulturen aus Saalesediment in batch- und Reaktorversuchen. *Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft* 4, TU-Berlin.

Nowak, J., Kirsch, N. H., Hegemann, W., & Stan, H.-J. (1996). Total reductive dechlorination of chlorobenzenes to benzene by a methanogenic mixed culture enriched from Saale river sediment. *Appl Microbiol Biotechnol* **45**, 700-709.

Ohkuma, M., Noda, S., Usami, R., Horikoshi, K., & Kudo, T. (1996). Diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic intestinal microflora of the termite *Reticulitermes speratus*. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2747-2752.

Oliver, B. G. & Nicol, K. D. (1982). Chlorobenzenes in sediments, water, and selected fish from lakes Superior, Huron, Erie, and Ontario. *Environ Sci Technol* **16**, 532-536.

Oremland, R. S., Hollibaugh, J. T., Maest, A. S., Presser, T. S., Miller, L. G., & Culbertson, C. W. (1989). Selenate reduction to elemental selenium by anaerobic bacteria in sediments and culture: biogeochemical significance of a novel, sulfate-independent respiration. *Appl Environ Microbiol* **55**, 2333-2343.

Oremland, R. S., Blum, J. S., Culbertson, C. W., Visscher, P. T., Miller, L. G., Dowdle, P., & Strohmaier, F. E. (1994). Isolation, growth, and metabolism of an obligately anaerobic, selenate-respiring bacterium, strain SES-3. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3011-3019.

Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J., & Olsen, G. J. (1986). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv Microb Ecol* **9**, 1-55.

Pace, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**, 734-740.

Pääbo, S., Irwin, D. M., & Wilson, A. C. (1990). DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *J Biol Chem* **265**, 4718-4721.

Palleroni, N. J. (1992). Introduction to the family *Pseudomonadaceae*. In The prokaryotes. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H., (eds). 2nd edition, New York, Berlin: Springer Verlag, 3071-3085.

Potrawfke, T., Timmis, K. N., & Wittich, R.-M. (1998). Degradation of 1,2,3,4-tetrachlorobenzene by *Pseudomonas chlororaphis* RW71. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3798-3806.

Rainey, F. A., Ward, N., Sly, L. I., & Stackebrandt, E. (1994). Dependence on the taxon composition of clone libraries for PCR amplified, naturally occurring 16S rDNA, on the primer pair and the cloning system used. *Experientia* **50**, 796-797.

Ramanand, K., Balba, M. T., & Duffy, J. (1993). Reductive dehalogenation of chlorinated benzenes and toluenes under methanogenic conditions. *Appl Environ Microbiol* **59**, 3266-3272.

Reysenbach, A.-L., Giver, L. J., Wickham, G. S., & Pace, N. R. (1992). Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3417-3418.

Rheims, H., Rainey, F. A., & Stackebrandt, E. (1996). A molecular approach to search for diversity among bacteria in the environment. *J Indust Microbiol* **17**, 159-169.

Robison-Cox, J. F., Bateson, M. M., & Ward, D. M. (1995). Evaluation of nearest neighbor methods for detection of chimeric small-subunit rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1240-1245.

Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1994). In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* **140**, 2849-2858.

Rosado, A. S., Duarte, G. F., Seldin, L., & van Elsas, J. D. (1998). Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2770-2779.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition, Cold Spring Harbour, N. Y.: Cold Spring Harbour Laboratory Press

Sanford, R. A., Cole, J. R., Löffler, F. E., & Tiedje, J. M. (1996). Characterization of *Desulfitobacterium chlororespirans* sp. nov., which grows by coupling the oxidation of lactate to the reductive dechlorination of 3-chloro-4-hydroxybenzoate. *Appl Environ Microbiol* **62**, 3800-3808.

Scharf, S. J., Horn, G. T., & Erlich, H. A. (1986). Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* **233**, 1076-1078.

Schmidt, T. M., DeLong, E. F., & Pace, N. R. (1991). Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J Bacteriol* **173**, 4371-4378.

Scholz-Muramatsu, H., Neumann, A., Messmer, M., Moore, E., & Diekert, G. (1995). Isolation and characterization of *Dehalospirillum multivorans* gen. nov., sp. nov., a tetrachloroethene-utilizing, strictly anaerobic bacterium. *Arch Microbiol* **163**, 48-56.

Schuppler, M., Mertens, F., Schön, G., & Göbel, U. B. (1995). Molecular characterization of nocardioform actinomycetes in activated sludge by 16S rRNA analysis. *Microbiology* **141**, 513-521.

Schuppler, M., Wagner, M., Schön, G., & Göbel, U. B. (1998). In situ identification of nocardioform actinomycetes in activated sludge using fluorescent rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microbiology* **144**, 249-259.

Seewaldt, E. & Stackebrandt, E. (1982). Partial sequence of 16S ribosomal RNA and the phylogeny of *Prochloron*. *Nature (London)* **295**, 618-620.

Sharak-Genthner, B. R., Price, W. A., & Pritchard, P. H. (1989). Characterization of anaerobic dechlorinating consortia derived from aquatic sediments. *Appl Environ Microbiol* **55**, 1472-1476.

Shelton, D. R. & Tiedje, J. M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl Environ Microbiol* **48**, 850-857.

Shin, Y. K., Hiraishi, A., & Sugiyama, J. (1993). Molecular systematics of the genus *Zoogloea* and emendation of the genus. *Int J Syst Bacteriol* **43**, 826-831.

Snaidr, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1997). Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2884-2896.

Song, B., Young, L. Y., & Palleroni, N. J. (1998). Identification of denitrifier strain T1 as *Thauera aromatica* and proposal for emendation of the genus *Thauera* definition. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 889-894.

Spain, J. C. & Nishino, S. F. (1987). Degradation of 1,4-dichlorobenzene by a *Pseudomonas* sp. *Appl Environ Microbiol* **53**, 1010-1019.

Stackebrandt, E. (1992). Unifying phylogeny and phenotypic diversity. In The prokaryotes. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (eds). 2nd edition, New York, Berlin: Springer Verlag, 219-47.

Stackebrandt, E., Liesack, W., & Witt, D. (1992). Ribosomal RNA and rDNA sequence analyses. *Gene* **115**, 255-260.

Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 846-849.

Stackebrandt, E. & Rainey, F. A. (1995). Partial and complete 16S rDNA sequences, their use in generation of 16S rDNA phylogenetic trees and their implications in molecular ecological studies. In Molecular microbial ecology manual. Akkermans, A. D. L., Van Elsas, J. D., De Bruijn, F. (eds). London: Kluwer Academic Publishers, 1-17.

Stahl, D. A., Flesher, B., Mansfield, H. R., & Montgomery, L. (1988). Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* **54**, 1079-1084.

Staley, J. T. & Konopka, A. (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* **39**, 321-346.

Steinberg, N. A., Blum, J. S., Hochstein, L., & Oremland, R. S. (1992). Nitrate is a preferred electron acceptor for growth of freshwater selenate-respiring bacteria. *Appl Environ Microbiol* **58**, 426-428.

Steinberg, N. A. & Oremland, R. S. (1990). Dissimilatory selenate reduction potentials in a diversity of sediment types. *Appl Environ Microbiol* **56**, 3550-3557.

Stoffels, M., Amann, R., Ludwig, W., Hekmat, D., & Schleifer, K. H. (1998). Bacterial community dynamics during start-up of a trickle-bed bioreactor degrading aromatic compounds. *Appl Environ Microbiol* **64**, 930-939.

Suzuki, M. T. & Giovannoni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* **62**, 625-630.

Tam, D. D., Shiu, W. Y., Qiang, K., & Mackay, D. (1996). Uptake of chlorobenzenes by tissue of the soybean plant-equilibria and kinetics. *Environ Toxicol Chem* **15**, 489-494.

To, L. P., Margulis, L., Chase, D., & Nutting, W. L. (1980). The symbiotic microbial community of the sonoran desert termite *Pterotermes occidentis*. *BioSystems* **13**, 109-137.

Tomei, F. A., Barton, L. L., Lemanski, C. L., Zocco, T. G., Fink, N. H., & Sillerud, L. O. (1995). Transformation of selenate and selenite to elemental selenium by *Desulfovibrio desulfuricans*. *J Indust Microbiol* **14**, 329-336.

Tomei, F. A., Barton, L. L., Lemanski, C. L., & Zocco, T. G. (1992). Reduction of selenate and selenite to elemental selenium by *Wolinella succinogenes*. *Can J Microbiol* **38**, 1328-1333.

Torsvik, V., Goksoyr, J., & Daae, F. L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* **56**, 782-787.

Torsvik, V., Daae, F. L., Sandaa, R. A., & Ovreas, L. (1998). Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J Biotechnol* **64**, 53-62.

Traunecker, J., Preuss, A., & Diekert, G. (1991). Isolation and characterization of a methyl chloride utilizing, strictly anaerobic bacterium. *Arch Microbiol* **156**, 416-421.

Tsai, Y.-L. & Olson, B. H. (1991). Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl Environ Microbiol* **57**, 1070-1074.

Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N., & Matsuguchi, T. (1995). Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *J Bacteriol* **177**, 1414-1417.

USEPA (U.S.Environmental Protection Agency). (1994). Locating and estimating air emissions from sources of chlorobenzenes (revised). *EPA-454/R-93-044, Office Of Air Quality Planning And Standards, Office Of Air And Radiation* 3.1.-3.15.

Utkin, I., Woese, C. R., & Wiegel, J. (1994). Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 612-619.

- Van der Meer, J. R., Roelofsen, W., Schraa, G., & Zehnder, A. J. B. (1987).** Degradation of low concentrations of dichlorobenzenes and 1,2,4-trichlorobenzene by *Pseudomonas* sp. strain P51 in nonsterile soil columns. *FEMS Microbiol Ecol* **45**, 333-341.
- Veiga, M. C., Jain, M. K., Wu, W. M., Hollingsworth, R. I., & Zeikus, J. G. (1997).** Composition and role of extracellular polymers in methanogenic granules. *Appl Environ Microbiol* **63**, 403-407.
- von Wintzingerode, F., Göbel, U. B., & Stackebrandt, E. (1997).** Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* **21**, 213-229.
- von Wintzingerode, F., Selent, B., Hegemann, W. & Göbel, U. B. (1999).** Phylogenetic analysis of an anaerobic, trichlorobenzene-transforming microbial consortium. *Appl Environ Microbiol* **65**, 283-286.
- Wang, G. C. Y. & Wang, Y. (1996).** The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. *Microbiology* **142**, 1107-1114.
- Wang, M. J., Mcgrath, S. P., & Jones, K. C. (1995).** Chlorobenzenes in field soil with a history of multiple sewage sludge applications. *Environ Sci Technol* **29**, 356-362.
- Weidner, S., Arnold, W., & Pühler, A. (1996).** Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **62**, 766-771.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991).** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* **173**, 697-703.
- Weller, R. & Ward, D. M. (1989).** Selective recovery of 16S rRNA sequences from natural microbial communities in the form of cDNA. *Appl Environ Microbiol* **55**, 1818-1822.
- Whitman, W. B., Bowen, T. L., & Boone, D. R. (1992).** The methanogenic bacteria. In *The prokaryotes*. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (eds). New York, N. Y.: Springer-Verlag, 739-745.
- Wild, A., Hermann, R., & Leisinger, T. (1996).** Isolation of an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates tetrachloroethene and trichloroethene. *Biodegradation* **7**, 507-511.
- Willems, A., De Ley, J., Gillis, M., & Kersters, K. (1991).** *Comamonadaceae*, a new family encompassing the acidovorans rRNA complex, including *Variovorax paradoxus* gen. nov., comb. nov., for *Alcaligenes paradoxus* (Davis 1969). *Int J Syst Bacteriol* **41**, 445-450.

Williams, R. A., Shuttle, K. A., Kunkler, J. L., Madsen, E. L., & Hooper, S. W. (1997). Intrinsic bioremediation in a solvent-contaminated alluvial groundwater. *J Indust Micobiol Biotechnol* **18**, 177-188.

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221-271.

Wohlfahrth, G. & Diekert, G. (1997). Anaerobic dehalogenases. *Curr Opin Biotechnol* **8**, 290-295.

Woods, S. L., Ferguson, J. F., & Benjamin, M. M. (1989). Characterization of chlorophenol and chloromethoxybenzene biodegradation during anaerobic treatment. *Environ Sci Technol* **23**, 62-68.

Yamamoto, T. & Horikoshi, M. (1995). Rapid preparation of plasmid templates suitable for a DNA sequencer without RNase treatment. *Nucl Acids Res* **23**, 3351-3352.

Zuckerlandl, E. & Pauling, L. (1965). Molecules as documents of evolutionary history. *J Theor Biol* **8**, 357-366.

VI ANHANG

Anhang VI.1 Sequenzalignment zweier repräsentativer Vertreter der Klonfamilie SJA-19. Gezeigt ist der Bereich zwischen *E. coli* 16S rRNA Position 1-123, in dem Klon SJA-19 eine 84 bp große Insertion besitzt. EscColi: *E. coli*; DebRe: *Dehalobacter restrictus* Stamm TEA.

	1				49
EscColi	AAAUUGAAGA	GUUUGAUCAU	GGCUCAGAUU	GAACGCUGGC	GGC-GGCCUA
SJA-19	-----AGA	GUUUGAUCCU	GGCUCAGGAC	GAACGCUGGC	GGCGUGCCUA
DebRe	-----	-----	-----	-----	---GUGCCUA
SJB-100	-----AGA	GUUUGAUCCU	GGCUCAGGAC	GAACGCUGGC	GGCGUGCCUA
	50				79
EscColi	ACACAUGCAA	GUCGAACG-G	UAACAG----	-----	---GAAGA-
SJA-19	ACACAUGCAA	GUCGAACGGA	G--CUACGCC	UGACACCGAG	UGC UUUGCNA
DebRe	ACACAUGCAA	GUCGAACGGA	G--AUAGUUA	-----	-----
SJB-100	ACACAUGCAA	GUCGAACGGA	G--AUAGUUA	-----	-----
	80				
EscColi	AG-----	-----	-----	-----	-----
SJA-19	UAGAU AUGUG	GAGCAAGCGA	GUGCGCGAAC	GAAGAGAGcG	CACCACGCAU
DebRe	-----	-----	-----	-----	-----
SJB-100	-----	-----	-----	-----	-----
					86
EscColi	----CUU-G-	-----	-----	-----	-----C
SJA-19	UAAAU AAGUG	CCAACACAUA	UUGAGUAUGA	AGG-----	-----AA
DebRe	-----	-----	-----	---UUGAAGC	UUGCGAUU--
SJB-100	-----	-----	-----	---AUGAAGC	UUGCGAUU--
	87				123
EscColi	UUCUUU----	-----G	CUGACGAGUG	GCGGACGGGU	GAGUAAUGUC
SJA-19	AAGCACUGGG	UGUCAGGUG-	GAGCUUAGUG	GCGAACGGGU	GAGU AACGCG
DebRe	-----	-----UAGC-	UAUCUUAGUG	GCGAACGGGU	GAGU AACGCG
SJB-100	-----	-----UAGC-	UAUCUUAGUG	GCGAACGGGU	GAGU AACGCG

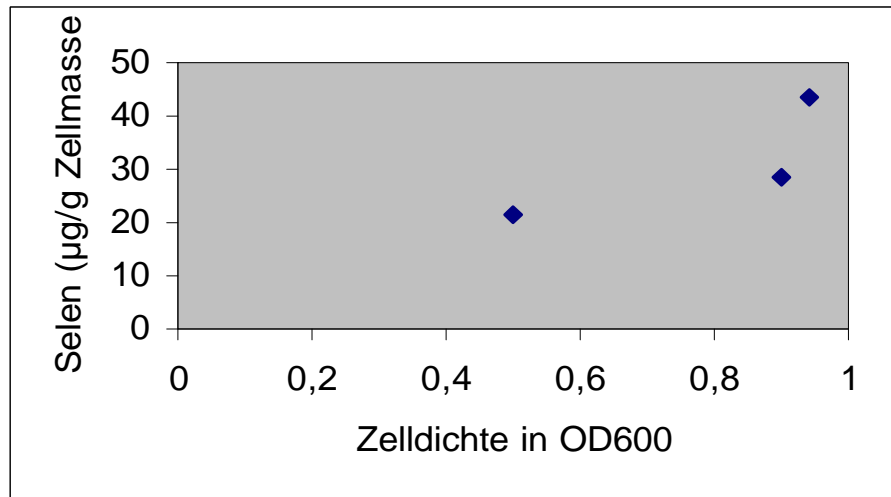
Anhang VI.2 Sequenzalignment der von PCR-amplifizierten *nifH*-Genfragmenten abgeleiteten Proteinsequenzen (SN-Sequenzen). Die konservierten Cysteine Cys-39, Cys-86 und Cys-98 sowie das konservierte Arginin-101 sind rot markiert (*Azotobacter vinelandii* [P00459] NifH-Nummerierung). AzoVi1, *Azotobacter vinelandii* NifH1; MetBa2, *Methanosarcina barkeri* NifH2; MetBa1, *M. barkeri* NifH1; MetTh1, *Methanococcus thermolithotrophicus* NifH1; DesGig, *Desulfovibrio gigas*; FraSpe, *Frankia* sp. strain FAC1; KlePne, *Klebsiella pneumoniae*; RhiLeg, *Rhizobium leguminosarum*; PleBof, *Plectonema boryanum* Chlorophyll Eisen Protein *frxC*; MetTh2, *Methanococcus thermolithotrophicus* NifH2; AzoTol, *Azoarcus tolulyticus* Stamm Td-1; MetJan, *Methanococcus jannaschii*; TKY1, PCR-Klon TKY1 (Ohkuma et al., 1996); TKY19, PCR-Klon TKY19 (Ohkuma et al., 1996); MetIva, *Methanobacterium ivanovii*.

	10		50
AzoVi1	AMRQCAIYGK	GGIGKSTTTQ	NLVAALAEM- GKKVMIVG ^{CD} PKADSTRLLI
SN-2	-----AFYGK	GGIGKSTTTQ	NLTAALATM- GNKILLVG ^{CD} PKADSTRMLL
SN-4	-----AFYGK	GGIGKSTTTQ	NLTAALATM- GNKILLVG ^{CD} PKADSTRMLL
SN-8	-----AIYGK	GGIGKSTISA	NLSAALADL- KKRVLQVG ^{CD} PKHDST-RLL
SN-10	-----AIYGK	GGIGKSTISA	NLSAALADL- KKRVLQVG ^{CD} PKHDST-RLL
SN-12	-----AFYGK	GGIGKSTVSS	NVAAALAEM- GKKVMQVG ^{CD} PKADCT-RNL
SN-13	-----AIYGK	GGIGKSSTAS	NVAAACAET- GKKVMIIG ^{CD} PKSDSS-ITL
SN-16	-----AFYGK	GGIGKSTTTQ	NLTAALATM- GNKILLVG ^{CD} PKADSTRMLL
SN-17	-----AIYGK	GGIGKSTTTQ	NTVAALAEM- GKKIMIVG ^{CD} PKADSTRLLI
SN-33	-----AIYGK	GGIGKSTTSS	NLSAALS ^{DL} - GLTVMQIG ^{CD} PKSDST-NNL
SN-40	-----AFYGK	GGIGKSTTQQ	NTAAAMAYFH GKKVFIHG ^{CD} PKADCTRLVL
SN-42	-----	GGIGKSTISA	NLSAALADL- KKRVLQVG ^{CD} PKHDST-RLL
MetBa2	-MRQIAIYGK	GGIGKSTTTQ	NLTASLSTM- GNKIMLVG ^{CD} PKADSTRMLL
MetBa1	MTRKIAFYGK	GGIGKSTTQQ	NTAAAMAYYH GKKIFIHG ^{CD} PKADCTRLVL
MetTh1	DAKKVAIYGK	GGIGKSTTTQ	NTAAALAYFF DKKVMIHG ^{CD} PKADSTRMIL
DesGig	-MRKIAIYGK	GGIGKSTTTQ	NTVAGLAEM- GKRVMVVG ^{CD} PKADSTRLLL
FraSpe	-MRQIAFYGK	GGIGKSTTQQ	NTMAAMAEM- GKKVMIVG ^{CD} PKADSTRLLI
KlePne	TMRQCAIYGK	GGIGKSTTTQ	NLVAALAEM- GKKVMIVG ^{CD} PKADSTRLLI
RhiLeg	ALRQIAFYGK	GGIGKSTTSQ	NTLAALVEL- GQKILIVG ^{CD} PKADSTRLLI
PleBof	--MKLAVYGK	GGIGKSTTSC	NISVALAKR- GKKVLQIG ^{CD} PKHDSTFTLT
MetTh2	-MKQIAFYGK	GGIGKSTTVC	NIAAALADQ- GKKVMVVG ^{CD} PKHDCT-SNL
AzoTol	-----	-----STTSQ	NTLAALAEM- GQKILIVG ^{CD} PKADSIRLLI
MetJan	-MRKFCVYGK	GGIGKSTTVS	NIAAALAED- GKKVLVVG ^{CD} PKADTT-RNL
TKY1	-----	-----STTTS	NLSAALSKL- GYKVMQFG ^{CD} PKSDST-NTL
TKY19	-----	-----STISA	NIAAVLGRR- GKKVLQIG ^{CD} PKHDST-RLL
MetIva	MSKRIAIYGK	GGIGKSTIVS	NIAAAYSKD- -YNVLVIG ^{CD} PKADTT-RTL

	51				89
AzoVi1	HSKAQNTIME	MAAEAGTV--	-----E	DLELEDVLKA	GYGGVKCVES
SN-2	GGLNQKTILD	TLRSEGD---	-----E	GVNLDVVVQP	GFGNIKCVES
SN-4	GGLNQKTILD	ALRSEGD---	-----E	GVNLDVVVQP	GFGNIKCVES
SN-8	HGGAEITTVL	DY LHETPQ--	-----E	VQQLEALVFE	GYGGTACVEA
SN-10	HGGAEIPTVL	GY LHETPQ--	-----E	VQQLEALVFE	GYGGTACVEA
SN-12	RGDREIPTIL	DVMREKGGDK	LELTEMGKGK	SIELDEVVFS	GFKGVL CVEA
SN-13	LGGRRIPTIL	DLLREGV---	-----D	VKE-KDVVFE	GYAGVK CVEA
SN-16	GGLNQKTILD	TLRSEGD---	-----E	GVNLEV VVQP	GFGNIKCVES
SN-17	NIKAQTTVMD	MARDKGSV--	-----E	DIELYDILYT	GYGDVRCAES
SN-33	RGGKSIPSVL	DALRSG----	-----K	RIEISDIVYE	GFNRIL CVEA
SN-40	GGVPQTTIMD	TLRDLGE---	-----E	SVTTENVVNT	GFQGIQCVES
SN-42	HGGAEIPTVL	DY LHETPQ--	-----E	VQQLEALVFE	GYGGTACVEA
MetBa2	GGLNQKT VLD	TLRSEGD---	-----E	GVDLDVVMQR	GFGDIKCVES
MetBa1	GGVAQTTIMD	TLRELGE---	-----D	AVTAENVINT	GFDGIKCVES
MetTh1	HGKPQDTVMD	VLREEGE---	-----E	AVTLEKVRKI	GFKDIL CVES
DesGig	GGLSQRTVLD	TLREEG----	-----E	DVDLDDIVSP	GFANTLCTES
FraSpe	HSKAQTSVIQ	LAAEKGSV--	-----E	DLELDEV LVE	GQWGIKCVES
KlePne	HAKAQNTIME	MAAEVGSV--	-----E	DLELEDVLQI	GYGDVRCAES
RhiLeg	NSKAQGT VLD	LAATKGSV--	-----E	DLELGDVLKT	GYGGIKCVES
PleBof	GFLIPTIIDT	LQEKDYHY--	-----E	DVWAEDVIYK	GYGGVD CVEA
MetTh2	RGGQEIPTVL	DILREKGLDK	LGLETIIEKE	MIEINDIIE	GYNGIY CVEA
AzoTol	HAKAQDTVLS	LAADAGSV--	-----E	DLELEDVLRV	GYRDIR CVES
MetJan	VGRKIPTVLD	VFRKKGA---	-----E	NMKLEDIVFE	GFGGVYCVES
TKY1	RDGTYIPTVL	DTLREK----	-----N	QVNAHEVIYK	GFNGIY CVEA
TKY19	LHGERITTVL	DY LKVTGP--	-----D	RCVLSDLVHE	GAFGVH CVEA
MetIva	IGKRLPTILD	IVKKK-----	-----K	NASIEEVLFE	GYGNVKCVES

	90				135
AzoVi1	GGPEPGVGCA	GRGVITAINF	LEEEGAYED-	-DLDFVIFYDV	LGDVVC GG
SN-2	GGPEPGVGCA	GRGIITSIGL	LENLGAYTD-	-DLDYVFYDV	LGDVVC GG
SN-4	GGPEPGVGCA	GRGIITSIGL	LENLGAYTD-	-DLDYVFYDV	LGDVVC GG
SN-8	GGPKPGIGCA	RGILSSFEA	LKRLGLRDS-	-SFDVVIYDV	LGDVVC GG
SN-10	GGPKPGIGCA	RGILSNFEA	LKRLGLRDS-	-SFDVVIYDV	LGDVVC GG
SN-12	GGPEPAVGCA	RGIKVAVEL	LRRLGVYRS-	-GLDVVIYDV	LGDVVC GG
SN-13	GGPEPGIGCA	RGIIVAIQK	LKSISGDLK	-EQDLIIYDV	PGDVVC GG
SN-16	GGPEPGVGCA	GRGIITSIGL	LENLGAYTD-	-DLDYVFYDV	LGDVVC GG
SN-17	GGPEPGVGCA	GRGVITAINF	LEENGAYTP-	-DLDYVFYDV	LGDVVC GG
SN-33	GGPEPGVGCA	RGIIITAIEL	LRQKNVFDEF	-KPDVVIYDV	LGDVVC GG
SN-40	GGPEPGVGCA	GRGVITAINL	MEELGAYSE-	-DLDFIHFDV	LGDVVC GG
SN-42	GGPKPGIGCA	RGILSSFEA	LKRLGLRDS-	-SFDVVIYDV	LGDVVC GG
MetBa2	GGPEPGVGCA	GRGIITSIGL	LENLGAYTD-	-DLDYVFYDV	LGDVVC GG
MetBa1	GGPEPGVGCA	GRGVITAINL	MEEMGAYSE-	-DLDFIHFDV	LGDVVC GG
MetTh1	GGPEPGVGCA	RGVITAVDM	MRELEGYPD-	-DLNLFFDV	LGDVVC GG
DesGig	GGPEPGVGCA	GRGIITSINL	LEQLGAFKEE	KKLDYTFYDV	LGDVVC GG
FraSpe	GGPEPAVGCA	RGVITSINY	LEEAGAYE--	-DLDFVTYDV	LGDVVC GG
KlePne	GGPEPGVGCA	RGVITAINF	LEEEGAYED-	-DLDFVIFYDV	LGDVVC GG
RhiLeg	GGPEPGVGCA	RGVITSINF	LEENGAYD--	-DVDYVSYDV	LGDVVC GG
PleBof	GGPPAGAGCG	YVVGETVKL	LKELNAFD--	-EYDVILFDV	LGDVVC GG
MetTh2	GGPKPGYGCA	RGVIVVIDL	LKKMNLYKDL	-KLDIVLYDV	LGDVVC GG
AzoTol	GGPEPGVGCA	GRGVITAINF	LEENGAYD--	-GVDYVSYDV	LG-----
MetJan	GGPEPGVGCA	RGVITAVDM	LNRLGA FEEL	-KPDVVIYDI	LGDVVC GG
TKY1	GGPAPGVGCA	RGIIITAVEL	FKQQRIFEEL	-DLDFVIYDV	LGDVVC GG
TKY19	GGPEPGVGCA	RGILTTFEL	LERLGIKQN-	-NYDTIIYDV	LGDVVC GG
MetIva	GGPEPGVGCA	RGVIVAMGL	LDKLGTFS-	-DIDI IYDV	LGDVVC GG

Anhang VI.3 Anaerobes Wachstum des selenatreduzierenden Isolats Se-34 in SNS04-Medium. X-Achse: Menge gebildeten Selen in $\mu\text{g/g}$ Zellmasse. Y-Achse: Zelldichte gemessen als OD_{600}



LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Friedrich Wasmuth Lotar Frhr. v. Wintzingerode-Knorr
geb. am 20.8.1970 in Wolfsburg

Schulische Ausbildung

1982-1989 Ratsgymnasium, Wolfsburg

Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung

10/1989-1/1995 Studium der Biologie an der Technischen Universität
Braunschweig

Abschluß: Diplom-Biologe

12/1993-1/1995 Diplomarbeit im Fach Mikrobiologie an der Deutschen
Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
(DSMZ), Braunschweig

Titel der Arbeit: „Phylogenetische und chemotaxonomi-
sche Hinweise auf die Anwesenheit neuer
Bakterienarten in einer Torflagerstätte in Ost-Nieder-
sachsen“

1/1995-3/1999 Anfertigung der Dissertation als Promotionsstipendiat
der „Studienstiftung des Deutschen Volkes“ (1/1996-
6/1998) am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der
Charité, Berlin

Publikationen

von Wintzingerode, F., Selent, B., Hegemann, W. & Göbel, U. B. 1999. Phylogenetic analysis of an anaerobic, trichlorobenzene-transforming microbial consortium. *Appl Environ Microbiol* **65**, 283-286.

Diehl, A., von Wintzingerode, F. & Görisch, H. 1998. Quinoprotein ethanol dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa*: Sequence of the gene and deduced structural properties of the enzyme. *Eur J Biochem* **257**, 409-419.

Engelen, B., Meinken, K., von Wintzingerode, F., Heuer, H., Malkomes, H.-P. & Backhaus, H. 1998. Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2814-2821.

von Wintzingerode, F., Göbel, U. B. & Stackebrandt, E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* **21**, 213-229.

von Wintzingerode, F., Rainey, F. A., Kroppenstedt, R. M. & Stackebrandt, E. 1997. Identification of environmental strains of *Bacillus mycoides* by fatty acid analysis and species-specific 16S rDNA oligonucleotide probe. *FEMS Microbiol Ecol* **24**, 201-209.

von Wintzingerode, F., Rösick, U., Siddiqui, R., Schumann, P., Rhode, M., Stackebrandt, E. & Göbel, U. B. *Candidatus candidatus*, gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic bacterium, belonging to the *Micrococcinaea* within the class *Actinobacteria*. In Vorbereitung

von Wintzingerode, F., Klein, A., Rösick, U., Siddiqui, R., Gross, R., & Göbel, U. B. *Bordetella petrii* sp. nov., a novel facultatively anaerobic *Bordetella* species isolated from the environment. In Vorbereitung

Schlötelburg, C., von Wintzingerode, F., Hauck, R., Hegemann, W. & Göbel, U. B. Uncultivated bacteria of an anaerobic, 1,2-dichloropropane-dechlorinating mixed culture are closely related to those of other anaerobic, dechlorinating consortia. In Vorbereitung

Abd El Haleem, D., von Wintzingerode, F. & Göbel, U. B. Detection of *Nitrosospira*-like bacteria in the rhizosphere of a constructed wetland system for treatment of municipal wastewaters. In Vorbereitung

Beiträge zu Tagungen

von Wintzingerode, F., Selent, B., Hegemann, W. & Göbel, U. B. Molecular diversity of a methanogenic mixed culture continuously degrading trichlorobenzene in a fluidized bed reactor. 49. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 5.-9.10. 1997, Jena (V168). Kurzvortrag

von Wintzingerode, F., Göbel, U. B., Selent, B. & Hegemann, W. Phylogenetic diversity of an anaerobic microbial community degrading chlorobenzene in a mixed bed reactor. 8. Congress of the International Union of Microbiological Societies (IUMS), Jerusalem. 18.-23.8.1996. Posterpräsentation

Abd El Haleem, D., von Wintzingerode, F., Hegemann, W. & Göbel, U. B. Phylogenetic analysis of ammonia oxidizing bacteria occurring in the nitrifying sections of two root-zone method based waste water treatment plants. 49. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Jena, 5.-9.10. 1997. Posterpräsentation

von Wintzingerode, F., Schlötelburg, C., Abd El Haleem, D. & Göbel, U. B. A new rapid screening method for environmental 16S rDNA clone libraries. Methodische Entwicklungen in der mikrobiologischen Nukleinsäure-Diagnostik, Berlin, 24.-25.4.1998. Posterpräsentation

Schlötelburg, C., von Wintzingerode, F. & Göbel, U. B. Molecular characterization of anaerobic 1,2-dichloropropane transforming enrichment cultures. Körper Symposium on Molecular and Microsensor Studies of Microbial Communities, Bremen, 7.-11.9.1998. Posterpräsentation

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Ich habe mich noch keinem Promotionsverfahren unterzogen und die Dissertation nicht in der gleichen oder einer anderen Fassung einer anderen Fakultät oder einem Prüfungsausschuß an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt.

Ich habe die Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin zur Kenntnis genommen.

Berlin, den 4.3.1999

.....